



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**FRANZ SALCES RUIZ**

**PROCESSO RÁPIDO PARA A OBTENÇÃO DE SOJA INTEGRAL PRÉ-COZIDA COM  
ALTO TEOR DE AGLICONAS**

**RAPID PROCESS FOR OBTAINING PRE-COOKED WHOLE SOYBEANS WITH HIGH  
CONTENT OF ISOFLAVONES AGLYCONES**

**CAMPINAS – SP 2019**

**FRANZ SALCES RUIZ**

**PROCESSO RÁPIDO PARA A OBTENÇÃO DE SOJA INTEGRAL PRÉ-COZIDA COM  
ALTO TEOR DE ISOFLAVONAS AGLICONAS**

**RAPID PROCESS FOR OBTAINING PRE-COOKED WHOLE SOYBEANS WITH HIGH  
CONTENT OF ISOFLAVONES AGLYCONES**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição – Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos.

Thesis presented to the Faculty of Food Engineering of the State University of Campinas as part of the requirements for obtaining the title of Doctor in Food and nutrition – Experimental and applied nutrition to food technology.

**ORIENTADOR: PROF. JAIME AMAYA FARFAN**

**ESTE TRABALHO  
CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA TESE DEFENDIDA  
PELO ALUNO **FRANZ  
SALCES RUIZ** ORIENTADA  
PELO **PROF. DR. JAIME  
AMAYA FARFAN**.**

**CAMPINAS – SP 2019**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

Sa31p Salces Ruiz, Franz, 1954-  
Processo rápido para a obtenção de soja integral pré-cozida com alto teor de agliconas / Franz Salces Ruiz. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Jaime Amaya Farfán.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Suplementos dietéticos. 2. Soja. 3. Biodisponibilidade. 4. Isoflavonas. I. Farfán Amaya, Jaime. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Rapid process for obtainin pre-cooked whole soybeans whit high content of isoflavones aglycones

**Palavras-chave em inglês:**

Dietary supplements

Soybean

Bioavailability

Isoflavones

**Área de concentração:** Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

**Titulação:** Doutor em Alimentos e Nutrição

**Banca examinadora:**

Jaime Amaya Farfán [Orientador]

Jorge Minoru Hashimoto

Maria Isabel Rodrigues

Flávio Luís Schmidt

Claudio Ernani Mendes da Silva

**Data de defesa:** 30-10-2019

**Programa de Pós-Graduação:** Alimentos e Nutrição

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-2704-0112>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5810978953896497>

## **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Jaime Amaya Farfan  
FEA / UNICAMP  
Presidente

Prof. Dr. Jorge Minoru Hashimoto  
EMBRAPA Meio-Norte  
Membro titular

Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues  
FEA / UNICAMP  
Membro titular

Prof. Dr. Flávio Luís Schmidt  
FEA / UNICAMP  
Membro titular

Prof. Dr. Claudio Ernani Mendes da Silva  
Univ. Fed. do Ceará Centro de Ciências Agrárias,  
Dep. de Tecnologia de Alimentos.  
Membro titular

Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.



## DEDICATORIA

*O Temor a Deus é o Princípio da Sabedoria e o  
Conhecimento do Santíssimo e a Inteligência.*

*Provérbios 9:10*

*A Deus criador do Universo e da Ciência, por me dar sabedoria,  
e às três mulheres mas importantes da minha vida, minha mãe Luz (in memoriam),  
minha irmã Sarah, e minha esposa Claudia, dignas representantes das minhas famílias  
boliviano-brasileiras, pela ajuda, apoio e ânimo para não desistir no caminho!*

## **AGRADECIMENTOS**

*A realização deste trabalho de tese somente foi possível com o apoio e ajuda do meu orientador Prof. Dr. Jaime Amaya Farfan, dos professores, servidores, colegas e amigos do DEPAN/FEA.*

*O presente trabalho foi realizado com o Apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – BRASIL (CAPES) – código financiamento 001*

*À Fapesp pelo financiamento desta pesquisa (Processo nº 2012/51521-8 Auxílio Pesquisa - Programa Inovação Tecnológica em Pequenas Empresas e à EMBRAPA Pelo fornecimento das matérias-primas.*

*Meus sinceros agradecimentos a todos!*

## RESUMO

O consumo das isoflavonas da soja continua crescendo em todo o mundo em resposta aos riscos de saúde associados à reposição hormonal com produtos de origem animal ou sintética. Devido ao grande potencial dos biocompostos presentes na soja, as empresas multinacionais estão investindo no desenvolvimento de uma nova geração de alimentos nutracêuticos ou funcionais, que contêm, além dos nutrientes convencionais, teores diferenciados de substâncias bioativas com ação antirradicais livres e capacidade de proteção da epiderme. No processamento convencional por via úmida, que apresenta grandes vantagens no consumo direto da soja, a maioria das substâncias solúveis (vitaminas, minerais, isoflavonas, saponinas, fitatos, inibidores de proteases, lectinas, peptídeos, lunasina etc.) são perdidas por lixiviação durante a hidratação dos grãos. No processo clássico, a hidratação é realizada por imersão dos grãos em excesso de água, até que a quantidade máxima de água seja absorvida para atingir uma maior eficiência na transferência de calor e permitir a transformação em produtos derivados, tais como extratos hidrossolúveis, tofu, iogurte etc. Este processo, no entanto, resulta na baixa recuperação de bioativos e nutrientes solúveis. Para evitar tais perdas, considerou-se necessário limitar a quantidade de água fornecida, de modo que os grãos atinjam a máxima hidratação sem deixar resíduos na água intersticial. Uma vez que isso não é possível pelo processamento convencional, um novo processo de hidratação foi desenvolvido através de um dispositivo constituído por um tanque rotativo que permite a hidratação progressiva da matéria-prima sem perda de sólidos solúveis. Este novo processo, denominado de *Processo de Hidratação Diferencial Controlada* (PHDC), além de hidratar com quantidades pré-determinadas de água, também permitiu incubar os grãos imediatamente após a hidratação no mesmo dispositivo. Posteriormente os grãos foram submetidos a tratamento térmico para obter a soja integral pré-cozida com alto teor de agliconas de alta biodisponibilidade devido à ativação das endoenzimas. Devido aos resultados relevantes obtidos com o PHDC, optou-se por explorar a possibilidade de se proceder diretamente da hidratação ao tratamento térmico, ignorando assim o passo intermediário de incubação. Quatro níveis de temperatura foram, portanto, estudados: 105, 115, 121 e 134 ° C. Os resultados mostraram níveis de transformação de isoflavonas glicosiladas e conjugadas em agliconas, semelhantes àqueles obtidos pelo processo de hidratação e incubação seguidos de pré-cozimento. Esta alternativa mostrou ser de grande potencial para a fabricação de produtos instantâneos de soja integral minimamente processados, com alto conteúdo de agliconas. Além de seu significado social e econômico, espera-se que esses achados contribuam para a busca de processos alimentares industriais mais simples que priorizem a produção sustentável de alimentos a preços mais acessíveis e mais saudáveis.

**Palavras-chave:** Suplementos dietéticos, Soja, Biodisponibilidad, Isoflavonas.

## ABSTRACT

The consumption of soybean isoflavones continues to grow worldwide in response to the health risks associated with hormonal replacement with products of animal or synthetic origin. Due to the great potential of biocompounds present in soybeans, multinational companies are investing in the development of a new generation of nutraceutical or functional foods, which contain, in addition to conventional nutrients, differentiated levels of bioactive substances with anti-free-radical action and the ability to protect the epidermis. In conventional wet processing, which has great advantages in direct soybean utilization, most of the soluble substances (vitamins, minerals, isoflavones, saponins, phytase, protease inhibitors, lectins, peptides, lunasin, etc.) are lost by leaching during hydration of the grains. The classic process the hydration is accomplished by immersing the grains in excess of water until the maximum amount of water is absorbed to attain the greatest efficiency of heat transfer and permit transformation of derived products, such as water-soluble extracts, tofu, yogurt, etc. This process, however, results in low recoveries of bioactives and soluble nutrients. To avoid such losses, it was deemed necessary to limit the amount of water supplied, so that the grains would reach maximum hydration without leaving residues in the interstitial water. Since this was not possible by conventional processing, a new process of controlled hydration was developed through a device consisting of a rotating tank that allowed the progressive hydration of the raw material without loss of soluble solids. This new process, called the Differential Controlled Hydration Process (PHDC), besides hydrating with pre-determined amounts of water, also permitted incubating the grains immediately following hydration. A final step of heat treatment was done to obtain the pre-cooked whole soybean product with high content of bioavailable isoflavone aglycones, most likely due to the activation of endoenzymes. Subsequently, due to the encouraging results obtained with the PHDC, it was decided to explore the possibility of proceeding directly from hydration to the heat treatment, thus skipping the intermediate step of incubation. Four temperature levels were therefore studied: 105, 115, 121 and 134 °C. The results showed levels of transformation of glycosylated and conjugated isoflavones in aglycones, similar to those obtained by the process of hydration and incubation followed by pre-cooking. This alternative showed to be of great potential for the manufacture of minimally processed whole soybean instant products with high contents of aglycones. Besides their social and economic significance, these findings are expected to contribute to the search for simpler industrial food processes that prioritize the sustainable production of less expensive and healthier foods.

**Keywords:** Dietary supplements Soybean, Bioavailability, Isoflavones.

## RESUMEN

El consumo de isoflavonas de soja sigue creciendo en todo el mundo en respuesta a los riesgos para la salud asociados con la sustitución hormonal de los productos de origen animal o sintéticos. Debido al gran potencial de los biocompuestos presentes en la soja, las empresas multinacionales están invirtiendo en el desarrollo de una nueva generación de alimentos nutracéuticos o funcionales, que contienen, además de nutrientes convencionales, niveles diferenciados de sustancias bioactivas con acción antiradicales libres y la capacidad de proteger la epidermis. En el procesamiento húmedo convencional, que tiene grandes ventajas en la utilización directa de la soja, la mayoría de las sustancias solubles (vitaminas, minerales, isoflavonas, saponinas, fitasa, inhibidores de la proteasa, lectinas, péptidos, lunasina, etc.) se pierden por lixiviación durante hidratación de los granos. El proceso clásico de la hidratación se logra sumergiendo los granos en exceso de agua hasta que se absorba la máxima cantidad de agua para lograr la mayor eficiencia de transferencia de calor y permitir la transformación de productos derivados, como los estratos solubles en agua, tofu, yogur, etc., entretanto, este proceso resulta en bajas recuperaciones de bioactivos y nutrientes solubles. Para evitar tales pérdidas, se consideró la posibilidad de reducir la cantidad de agua suministrada, de modo que los granos alcanzaran la máxima hidratación sin dejar residuos en el agua intersticial. Dado que esto no es posible por el procesamiento convencional, se desarrolló un nuevo proceso de hidratación controlada através de un dispositivo que consiste en un tanque giratorio que permitió la hidratación progresiva de la materia prima sin pérdida de sólidos solubles. Este nuevo proceso, llamado Proceso de Hidratación Diferencial Controlada (PHDC), además de hidratar con cantidades predeterminadas de agua, también permitió incubar los granos inmediatamente después de la hidratación. Se realizó también una etapa final de tratamiento térmico para obtener el producto de soja entera precocinado con alto contenido de isoflavonas biodisponibles, probablemente debido a la activación de las endoenzimas. Posteriormente, debido a los resultados alentadores obtenidos con la PHDC, se decidió explorar la posibilidad de pasar directamente de la hidratación al tratamiento térmico, omitiendo así el paso intermedio de la incubación. Por lo tanto, se estudiaron cuatro niveles de temperatura: 105, 115, 121 y 134° C. Los resultados mostraron niveles de transformación de isoflavonas glicosiladas y conjugadas en agliconas, similares a los obtenidos por el proceso de hidratación e incubación seguido por la precocción. Esta alternativa demostró ser de gran potencial para la fabricación de productos instantáneos de soja entera mínimamente procesados con alto contenido de agliconas. Además de su importancia social y económica, se espera que estas descubiertas contribuyan con la búsqueda de procesos alimentarios industriales más simples que prioricen la producción sostenible de alimentos más baratos y saludables.

**Palabras clave:** Suplementos dietéticos, Soja, Biodisponibilidad, Isoflavonas.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 – Processo rápido para a obtenção de Soja Integral Pré-Cozida com Alto Teor de Isoflavonas Agliconas.....</b>	<b>12</b>
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
<b>CAPÍTULO 2 – Novel process of hydration, followed by incubation and thermal processing, for high isoflavone bioconversion in soybeans.....</b>	<b>20</b>
<b>CAPÍTULO 3 – Accelerated Bioconversion of Isoflavones in Whole Soybean using Controlled Hydration and Thermal Treatment.....</b>	<b>28</b>
<b>CAPÍTULO 4 - DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
1. Tempo de Hidratação (t <sub>H</sub> ) .....	45
2. Otimização do tempo de hidratação (t <sub>H</sub> ) .....	45
3. Conversão de Isoflavonas em Agliconas e Derivados durante o Processo de hidratação Diferencial Controlado - PHDC.....	46
4. Retenção de Isoflavonas .....	55
5. Incubação.....	55
6. Otimização do tempo de incubação (T <sub>I</sub> ) .....	57
7. Pré-cozimento a 121 °C.....	58
8. Conversão das Isoflavonas Malonil Glucossídicas.....	58
9. Conversão de Isoflavonas durante o processo de Hidratação Diferencial Controlada e do Tratamento Térmico em Quatro Temperaturas.....	59
<b>CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES.....</b>	<b>63</b>
1. Processo de Hidratação Diferencial Controlada - PHDC.....	63
2. Desenvolvimento e Construção do PHDC-Rotator.....	64
3. Otimização.....	63
4. Incubação.....	64
5. Pré-cozimento a 121°C.....	64
6. Tratamento Térmico em 4 Temperaturas .....	65

<b>7. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS.....</b>	<b>66</b>
8. Cinética de hidratação.....	66
9. Incorporação de sólidos solúveis.....	66
10. Vantagens do PHDC em relação aos métodos convencionais de hidratação.....	66
<b>CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS.....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>71</b>
<b>1. ANEXO I.....</b>	<b>72</b>
1.1 PHDC-Rotator - Equipamento experimental Escala de Laboratório.....	72
<b>2. ANEXO II.....</b>	<b>73</b>
2.1 MATÉRIA-PRIMA - Cultivar de Soja BRS 216 produzida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA.....	73
<b>3. ANEXO III.....</b>	<b>74</b>
3.1 Determinação do fator de redução ( $f_{veff}$ ) do volume efetivo de hidratação ( $V_{eff}$ )..	74
3.2 I-Testes preliminares de hidratação convencional (estática) da Soja.....	74
3.3 II- Cálculos do percentual de solvente residual em relação ao $V_{eff}$ .....	75
3.4 III- Determinação do fator de redução do volume efetivo ( $V_{eff}$ ).....	76
3.5 IV- Aplicação do fator $f_{veff}$ (0,85) no Processo de Hidratação Diferencial Controlada PHDC.....	77
<b>4. ANEXO IV.....</b>	<b>79</b>
2.3 Submissão do Artigo II.....	79
<b>5. ANEXO V.....</b>	<b>80</b>
4.1 Identificação das isoflavonas através da comparação dos tempos de retenção dos espectros de absorção ultravioleta dos compostos separados.....	80
4.2 ANOVA - Análise dos Resultados .....	88
<b>6. Anexo VI.....</b>	<b>98</b>
Autorização da editora para inclusão dos artigos já publicados.....	98

**CAPÍTULO 1 – Processo rápido para a obtenção de Soja Integral Pré-Cozida  
com Alto Teor de Isoflavonas Agliconas**



## 1. INTRODUÇÃO

Inúmeros estudos mostram que a soja é um alimento-commodity de grande eficiência na nutrição humana. Além de contribuir para a produção de energia, é rica em proteínas, vitaminas, minerais, fibras de alta qualidade e compostos bioativos, como isoflavonas, saponinas, fitatos, inibidores de proteases, lectinas, peptídeos bioativos e oligossacarídeos. O impacto da alimentação na redução de doenças crônicas, como mostrado por testes epidemiológicos, se evidencia na melhor qualidade de vida das populações com consumo expressivo destes compostos (Setchell, K.D.L et al. 1999).

Segundo a FDA e a American Heart Association, o consumo diário de 20 a 25 g de soja e derivados reduz os riscos de doenças cardíacas, câncer de mama e próstata em até 50%. Proporciona ação preventiva contra o câncer de cólon, reto, estômago e pulmão, devido à ação das isoflavonas que inibem o desenvolvimento de tumores malignos. Também reduz os níveis do colesterol LDL e triglicerídeos no sangue.

As isoflavonas são fitoestrogênios encontrados apenas em leguminosas, sendo que somente na soja se encontram em quantidades significativas (entre 1,5 e 2g/100g, Soja. ILSI Brasil, 2007), enquanto no feijão comum (*Faseoulos vulgaris* L), o teor de isoflavonas não é significativo. Segundo Dinelli et al. (2006), o conteúdo total de flavonoides, no feijão, varia entre 0,019 e 0,084 g/100g dos grãos frescos. Por outra parte, as fibras da soja, por si só, representam um incentivo para o consumo desta semente na sua forma integral, devido ao poder de prevenção da aterosclerose e câncer intestinal, regulação dos níveis de glicose no sangue, redução dos cálculos biliares e doenças renais.

Parte do grande volume de informação técnico-científica existente no país e no exterior descreve os problemas relacionados à tentativa de melhor aproveitar o potencial dessas substâncias na elaboração de produtos farmacêuticos, terapêuticos e alimentos funcionais. Entretanto, o nível de sofisticação apresentado pelos métodos e processos descritos para a extração de substâncias com maior biodisponibilidade, eleva as isoflavonas a um status de medicamento de alto valor, limitando o seu acesso à população em geral, apesar de a soja ser matéria-prima abundante e barata no Brasil.

A soja é uma rica fonte das isoflavonas daidzeína, genisteína e gliciteína, presentes no grão na forma de derivados glicosilados (malonilglicosídeos e B-glicosídeos desesterificados), os mesmos que durante o processamento podem formar agliconas e acetilglicosídeos

(Genovese, Lajolo, 2001). As agliconas com maior biodisponibilidade são encontradas na soja em quantidades mínimas (menos de 1%); somente o tratamento hidrotérmico converte cerca de 40% das isoflavonas totais em agliconas. Esses teores, associados à ação das enzimas  $\beta$ -glicosidasas endógenas da soja, durante a hidratação dos grãos, podem resultar em altos níveis de conversão das isoflavonas totais em agliconas (Goes-Favoni, et al., 2005).

Os processos de extração, purificação, hidrólise enzimática, tratamento térmico e acondicionamento, além de caros, implicam em grandes perdas de sólidos solúveis por lixiviação, degradação térmica e física, gerando grandes quantidades de subprodutos e consumo elevado de água e energia. Mesmo contando com variedades de soja com sabor adequado ao gosto do consumidor, alto teor de biocompostos e custos baixos, os produtos resultantes dos processos convencionais sofrem perdas substanciais de biocompostos, especialmente das isoflavonas, comprometendo assim, a funcionalidade dos produtos.

Nos grãos submetidos à hidratação em água a temperaturas próximas à ebulição, a perda de isoflavonas, somente na operação unitária de hidratação, é superior a 50%, devido à migração para a fase líquida circundante (Wang, 1995). As tecnologias utilizadas para o processamento de soja e derivados não evoluíram a ponto de evitar as perdas dos sólidos solúveis por lixiviação para o meio circundante durante a hidratação dos grãos. Assim, todos os esforços dirigidos à obtenção de matérias-primas com atributos sensoriais melhorados e valores nutricionais e funcionais superiores não são compensados pelo emprego dos processamentos convencionais inadequados.

Consequentemente, muitos dos produtos derivados da soja, comercializados como fontes de isoflavonas, apresentam teores muito inferiores ao declarado (Genovese et al, 2003) ou pretendido, chegando, em alguns casos, a serem insignificantes, como constatado em pesquisa de Rossi et al. (2004), na qual se mostrou que “iogurte” de soja teve redução dos teores de isoflavonas de 100 para 7,7%, do conteúdo dos grãos antes do processamento, concluindo que esse produto não deveria ser considerado como fonte segura de isoflavonas. Entretanto, nossos testes preliminares em escala de laboratório mostraram uma nova possibilidade de hidratar os grãos sem perdas significativas de sólidos solúveis através de um novo processo de hidratação controlada. As considerações a seguir ilustram de forma sintética os fundamentos desta proposta de pesquisa que apresenta um grande potencial de aplicação em escala industrial.

O armazenamento seguro da soja requer que os grãos, antes de serem colhidos, passem por um processo natural de secagem ao sol ainda nas vagens. Normalmente, a secagem natural dos grãos é complementada com uma secagem artificial com ar quente nos silos de armazenamento, de maneira que os grãos se mantenham sem mudanças significativas antes do processamento industrial. Este pré-processamento reduz o teor de umidade dos grãos, do seu estado natural com hidratação total (grãos verdes), até níveis compatíveis com um armazenamento seguro do ponto de vista biológico, químico e microbiológico. Os grãos não brotam, a sua composição química não muda de forma considerável e não há proliferação de microorganismos patogênicos ou deteriorativos. Essa condição estável dos grãos no armazenamento é normalmente modificada durante o processamento industrial, através do processamento via seca ou via úmida. É importante ressaltar que o processamento industrial da soja por via seca constitui mais de 90% do total da produção agrícola, face ao seu uso na produção de óleo e subprodutos ricos em proteínas, normalmente usados de forma direta ou indireta para consumo animal e humano. Porém, o processamento por via úmida apresenta um potencial muito grande, visando o uso da soja integral na alimentação direta, com substanciais vantagens, tanto nutricionais e funcionais quanto econômicas. É importante enfatizar as conveniências econômicas e ambientais decorrentes do consumo direto das proteínas de origem vegetal, principalmente da soja, em relação às de origem animal, considerando alguns fatores relacionados à produção de alimentos saudáveis, baratos, de alta produtividade e sustentáveis.

A despeito dessas vantagens na produção e industrialização dessa importante matéria-prima, existem outras propriedades nutricionais e funcionais que não estão sendo aproveitadas plenamente devido ao tipo de processamento por via úmida, fazendo com que a maior parte das substâncias responsáveis por essas propriedades sejam eliminadas. É o caso das vitaminas e minerais, oligossacarídeos, peptídeos, isoflavonas, etc, cujas perdas são consideráveis, quando se avalia o objetivo de produzir um alimento que, além da conveniência, seja também um veículo de substâncias funcionais e nutricionais. Percebe-se que, definitivamente os métodos tradicionais de hidratação não atendem às exigências da produção de novos alimentos de conveniência nutritivos, funcionais e sensorialmente adequados para as grandes e modernas populações urbanas em crescimento constante.

A redução do grau de umidade inicial dos grãos, embora seja uma condição adequada para o armazenamento e posterior processamento da soja por via seca, não é necessariamente

benéfico para o processamento por via úmida dos grãos integrais, pois é necessário que os grãos sejam hidratados novamente, recuperem a sua condição inicial, correspondente ao grão “verde”, com teor de umidade natural, para alcançar maior eficiência na transferência de calor, na extração dos sólidos solúveis, no cozimento, etc. Nos processos convencionais por via úmida, a hidratação dos grãos em excesso de água é uma condição necessária para que os grãos possam absorver a água distribuída nos espaços intersticiais (o volume de água intersticial deve permanecer de forma constante durante todo o processo de hidratação). Em função dessa condição, os volumes de água utilizados para se atingir a hidratação total devem ser equivalentes ao volume intersticial (espaço entre os grãos) mais o volume total absorvido pelos grãos, exigindo que os processos por via úmida normalmente utilizem volumes maiores que três vezes o volume inicial dos grãos, pois tanto o volume dos grãos como o espaço intersticial variam em função do tempo, das condições operacionais de hidratação (temperatura, agitação, etc.) e das características das matérias-primas (tamanho de partícula, conteúdo inicial de umidade, etc.).

Em resumo, o ambiente de hidratação é dinâmico e, conseqüentemente, a operação unitária de hidratação constitui o principal fator de perdas dos sólidos solúveis lixiviados na água residual intersticial ou sobrenadante, após os grãos atingirem a hidratação máxima (água equivalente). Assim, quanto maior for o volume residual da água intersticial, maiores serão as perdas dos sólidos solúveis. Em função dessas observações, as perdas das biomoléculas e micronutrientes solúveis dos grãos na água de hidratação residual poderiam ser evitadas se, na hidratação dos grãos, fosse usada somente a quantidade de água equivalente (entre 100 a 130% do peso dos grãos secos), resultando na retenção total das substâncias funcionais e nutricionais, que é o objetivo principal desta pesquisa.

A princípio, podemos dizer que é possível fornecer somente a quantidade de água necessária para que os grãos sejam totalmente hidratados. Essa condição hipotética mostra que não tendo água residual intersticial livre ou circundante, não haveria perdas de nutrientes por lixiviação. Baseado nessa observação, foi elaborada esta hipótese que contempla a solução dos problemas decorrentes das perdas de sólidos solúveis durante a hidratação dos grãos, de acordo com o procedimento a seguir:

- 1- Determinação do volume de água equivalente dos grãos, ou seja, a água necessária para a hidratação total dos grãos, através da cinética de absorção de água;

- 2- Desenvolvimento de uma metodologia de hidratação que permita administrar somente a quantidade necessária para alcançar a absorção máxima dos grãos, sem resíduo de água intersticial, ou água em excesso.

Esta metodologia permitiu a incorporação da água equivalente aos grãos com a consequente manutenção dos biocompostos e o desenvolvimento de uma nova tecnologia incremental de hidratação sem perda de sólidos solúveis, de fácil implantação em escala industrial. Testes preliminares de hidratação total dos grãos realizados em escala de laboratório mostraram a viabilidade técnica do desenvolvimento do Processo de Hidratação Diferencial Controlada (PHDC) para a produção de Soja Integral Pré-cozida com Alto Teor de Agliconas, e outras aplicações na área de alimentos.

Assim, a obtenção de soja com alta retenção de biocompostos foi decorrente da hidratação dos grãos com o volume de água equivalente ao teor de água contida nos grãos “verdes”, substituindo o equipamento de hidratação convencional pelo PHDC-Rotator, construído de acordo com o novo conceito do PHDC, processo dinâmico que introduziu novas variáveis como o volume equivalente (que limita a quantidade das soluções de hidratação) e a formação de uma película fina de água ou solvente na superfície total dos grãos pela rotação contínua do cesto do equipamento que, além de mantê-los permanentemente molhados, aumenta a velocidade de hidratação.

Além dos aspectos funcionais e econômicos decorrentes da alta retenção de biocompostos durante a hidratação controlada (PHDC), o novo processo permite também que todos os sólidos solúveis da soja participem de forma sinérgica nas dietas em geral (Cassidy et al., 2006), aumentando de forma substancial a disponibilidade ou quantidade de micronutrientes e biomoléculas por unidade de peso de soja consumida. Isso reduz, consideravelmente, a quantidade de soja a ser ingerida para se obterem os benefícios funcionais, encorajando o consumo, mesmo por aqueles que não têm o hábito de utilizá-la nas refeições diárias, seja por aspectos étnicos ou culturais, mas que precisam dos benefícios das isoflavonas.

Em adição às considerações técnicas mencionadas, o retorno social e econômico do desenvolvimento do processo rápido para a obtenção de Soja Integral Pré-cozida com Alto Teor de Agliconas fica mais evidente quando observamos a marginalização da população brasileira de baixa renda no que diz respeito ao acesso a alimentos-fonte de componentes

funcionais e nutricionais. Ainda, a incorporação do PHDC nos processos convencionais de pré-cozimento sob pressão representa um avanço tecnológico de significativa relevância que permitirá o acesso das populações de todos os níveis sociais aos alimentos de conveniência, com baixo grau de processamento e de grande aceitação, que transportem nutrientes e substâncias, justamente em uma época de muita crítica aos produtos alimentícios altamente processados (Moubarac et al., 2014).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Desenvolvimento do Processo de Hidratação Diferencial Controlada de Alta Retenção de Sólidos Solúveis (PHDC) para a produção de Soja Integral Pré-cozida com Alto Teor de Isoflavonas Agliconas.

### **2.2 Objetivos Específicos**

**2.2.1** Estudar os parâmetros operacionais do Processo de Hidratação Diferencial Controlada (PHDC);

**2.2.2** Estudar os parâmetros operacionais de maior influência na transformação das isoflavonas em agliconas pelas ação das enzimas endógenas da soja, durante a hidratação pelo PHDC, a incubação e o tratamento térmico;

**2.2.3** Estudar o efeito do tratamento térmico em quatro níveis de temperatura na transformação das isoflavonas em agliconas, após a hidratação dos grãos de soja pelo PHDC.

**CAPÍTULO 2 – Novel process of hydration, followed by incubation and thermal processing for high isoflavone bioconversion in soybeans**

Franz R. Salces, Maurício A. Rostagno and Jaime Amaya-Farfan





## Novel process of hydration, followed by incubation and thermal processing, for high isoflavone bioconversion in soybeans



Franz R. Salces<sup>a</sup>, Mauricio A. Rostagno<sup>b</sup>, Jaime Amaya-Farfan<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Food and Nutrition Department (DEPAN), School of Food Engineering (FEA), University of Campinas (UNICAMP), Rua Monteiro Lobato, 80, Campinas, SP 13083-862, Brazil

<sup>b</sup> School of Applied Sciences (FCA), University of Campinas (UNICAMP), R. Pedro Zaccaria, 1300, P.O. Box 1068, ZIP code:13484-350 Limeira, São Paulo, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Nutraceuticals  
Legumes  
Precooking  
Bioavailability  
Conjugates  
β-Glucosidase

### ABSTRACT

The potentially bioavailable aglyconic isoflavone content of soybeans was increased by a process based on the controlled hydration of whole beans, followed by an incubation step and cooking. For developing the process, the effects of three operation variables: temperature, intermittent soaking and incubation time on the isoflavone profile of the processed soybeans were assessed. By hydrating the whole beans under controlled conditions (54 °C; 15 rpm for a rotating soaking basket) and holding the beans for an appropriate incubation time, it was possible to substantially increase the total aglycone content from ( $\mu\text{mol}\cdot 10^{-2}\cdot\text{g}^{-1}$ ) ~5 in the raw, to ~95 in the processed soybean. A conventional thermal treatment (1 kg·cm<sup>-2</sup>, 5 min), necessary to attain the nutritional and sensory characteristics, produced additional hydrolysis of glucosides, accounting for extra 14% of total aglycone yield. The entire process avoided the need to grind the bean and permitted an overall 21.8-fold increase (per-mole basis) conversion of all forms of isoflavone glucosides to aglycones, particularly to the (S)-equol precursor, daidzein, and with minimal back-diffusion or leaching to the outside medium.

### 1. Introduction

The use of soybeans as human food gained renewed interest this century because of its potential health benefits. A number of studies have reported positive correlations between soybean consumption and lower risk of cardiovascular diseases, cancer, osteoporosis and menopause symptoms among other chronic diseases. Such health benefits are known to be related to bioactive components of soybeans, among which most relevant and studied are the isoflavones (Banerjee, Li, Wang, & Sarkar, 2008; Curtis et al., 2012; Lee et al., 2003; Liu et al., 2012; Messina, 2014; Steiner, Arnould, Scalbert, & Manach, 2008).

In order to be safely consumed, however, trypsin inhibitors and other anti-nutrients naturally present in soybeans need to be inactivated by an appropriate process, the simplest of which consists of cooking in water, just as is done with other leguminous seeds. In soybeans, the isoflavones are present mainly as malonyl glucosides and unconjugated glucosides, while aglycones are present in minor amounts. Numerous studies have shown that isoflavone aglycones are more rapidly and efficiently absorbed than the corresponding glucosides, while the malonyl conjugates of genistin and daidzin are less bioavailable (Okabe, Shimazu, & Tanimoto, 2011; Vitale, Piazza, Melilli, Drago, & Salomone, 2013; Yerramsetty, Gallaher, & Ismail,

2014; Yonemoto-Yano et al., 2014).

In addition, the isoflavone structures can undergo other chemical changes during processing of soybeans and soy products, the most frequent of which are decarboxylation of malonyl glucosides to acetyl glucosides and hydrolysis of the malonyl and acetyl glucosides to glucosides. It is also possible for a glucoside to generate its corresponding aglycone by thermal or enzymatic hydrolysis (Rostagno, Palma, & Barroso, 2004; Rostagno, Villares, Guillon, García-Lafuente, & Martínez, 2009; Villares, Rostagno, García-Lafuente, Guillon, & Martínez, 2011). Thermal hydrolysis refers to the cleavage of an ether bond by the addition of water at a sufficiently high temperature, while enzymatic hydrolysis can proceed by either thermally activating the soybean's endogenous β-glucosidases or by enzymes added from external sources.

During conventional soybean cooking, the extent of hydrolysis is limited because of mechanistic impediments of the endogenous enzymes or losses, so that only a small fraction of the glucosides may be transformed into aglycones and be recovered (Wang & Murphy, 1996). Resorting to pre-soaking in order to activate the endogenous enzymes could increase the bioconversion to aglycones, but this has usually resulted in losses due to out-diffusion or leaching, whereas attempts to use higher temperatures or longer processing times to obtain higher

\* Corresponding author.

E-mail address: [jaf@unicamp.br](mailto:jaf@unicamp.br) (J. Amaya-Farfan).

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.040>

Received 9 August 2018; Received in revised form 16 December 2018; Accepted 22 December 2018

Available online 25 December 2018

0963-9969/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

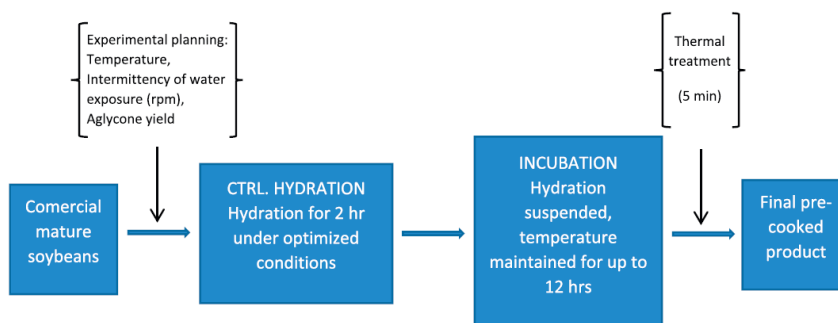


Fig. 1. Schematics of the three-step process: First, the beans are loaded in the controlled-hydration processor and allowed to hydrate for two hours in a limited (effective) volume of water at the selected temperature. In the second step, and in the absence of any additional water, the load of hydrated beans is held at this temperature for up to 12 h (incubation). Lastly, the process is finished by autoclaving the load (thermal treatment) for 5 min.

conversion rates have been only partly successful because of the small yields and rising energy costs (Góes-Favoni, Carrão-Panizzi, & Beleia, 2010; Rostagno et al., 2009; Tipkanon et al., 2010).

Therefore, the purpose of this work was to explore a new simple strategy that permits higher endogenous enzyme action, while avoiding the loss of products thus making it possible to increase the rate of glucoside conversion during industrial cooking. This new approach takes advantage of the natural matrix array to obtain high enzymatic biotransformation efficacy and substantially enhance the contents of some of the beans' bioactive components.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sample

The raw material used for all experiments was soybean cultivar BRS 216 (2014 harvest), kindly donated by the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa). Upon reception, the material was stored under refrigeration until submitted to the experimental processing conditions. In order to determine the water content of the sample, soybeans were dried in an oven at 105 °C for a period of 24 h and the moisture decrease monitored to constant weight (in triplicate). The water content of the starting material was determined to be  $8.74 \pm 0.11\%$ .

### 2.2. Solvents and reagents

Analytical grade ethanol (Labsynth, Diadema, SP, Brazil) was used for the extraction of isoflavones. Acetonitrile (HPLC grade, from JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA) was used as mobile phase for the analysis of isoflavones. Methanol (HPLC grade, from Merck, Darmstadt, Germany) was used for preparing stock solutions of isoflavone standards. Ultra-pure water was obtained from a Milli-Q Advantage A10 water system (Millipore, Bedford, MA, USA). Standards of isoflavones daidzin (Di), glycitin (Gly), genistin (Gi), daidzein (De), glycitein (Gle) and genistein (Ge) were acquired from LC Labs (Woburn, MA, USA). Standard purity was higher than 98%. Stock solutions of all standards were prepared in 80% methanol and stored at  $-20$  °C until used for analysis.

### 2.3. Controlled hydration processing equipment and processing (CH-Processor)

The proposed process included the following stages: clean-up, controlled hydration, incubation, thermal treatment and cooling. The process was accomplished in an apparatus developed for the study (CH

Processor, or CHP; Supplementary Fig. S1), consisting of a rotating basket partially submerged in a water reservoir, maintained under controlled temperature and speed of rotation. Temperature and rotation speed could be adjusted within the range of 30 to 100 °C and from 0 to 30 rpm, respectively. The CHP was operated as follows: after defining the operating conditions, the temperature and speed parameters were set, the required or effective volume ( $V_{eff}$ ) of water was allowed to reach equilibrium temperature, and the mass of grains to be rehydrated, already inside the hydration basket, was processed for a given length of time.

Immediately before processing, the raw material underwent a clean-up routine. The soybeans were rinsed for 30 s with unheated water to remove any foreign material such as dust, soil, or small insects, by gently spinning the rotating basket inside the wash tank.

### 2.4. Maximum and effective absorbable volumes ( $V_{max}$ , $V_{eff}$ )

The maximum absorbable volume ( $V_{max}$ ) of water was determined by statically soaking the soybeans in excess distilled water (4:1 water/soybean mass) at room temperature for 12 h. In earlier hydration attempts, we observed that water uptake by the grains occurred rather fast in the first couple of hours while the last 15% of the volume took a long time to be absorbed. From there, it was concluded that the volume effectively absorbed approached only 85% of  $V_{max}$ , so that 85% of  $V_{max}$  was defined as  $V_{eff}$ , and the hydration step was then stopped at that point.

### 2.5. Controlled hydration process (CHP)

The entire process consisted of three steps: two hours of hydration, 12 h of incubation and five minutes of thermal treatment (Fig. 1 and supplementary Fig. 1). A selected load of soybeans was placed inside the rotating basket partly submerged in a volume of water limited to 85% of  $V_{max}$ , and submitted to different water-uptake times and temperatures. Temperatures ranging between 30 and 80 °C and speeds of rotation of the basket between 5 and 15 rpm were tried, thus requiring different times for the  $V_{eff}$  to be completely absorbed. The influence of the independent variables (hydration water temperature and basket rotation speed) of the CHP on the isoflavone profile of the whole soybeans was determined by response surface methodology (RSM) using a  $2^2$ -Composite Rotatable Design that included four experiments in the axial conditions and 3 repetitions at the central point. The levels of the independent variables and their responses for use in the CHP are shown in Table 1, and the experimental design in Table 2. The RSM experimental design was developed using the software Statistica, version 7.0 (StatSoft, Oklahoma, OK, USA).

**Table 1**  
Operational variables and levels of the controlled hydration process (CHP).

Levels/Variables	X (Hydration water temperature, °C)	Y (Rotation Speed – RPM)
–1.41	30	5
–1	37	7
0	55	10
+1	73	13
+1.41	80	15

**Table 2**  
Experimental design for the of the controlled hydration process (CHP).

Experiment	X (Temperature) °C		Y (Speed, drum rotation) rpm		Time to water uptake (min)	Moisture of grain (%)
1	−1	37	−1	7	240	59.72
2	+1	73	−1	7	85	58.15
3	−1	37	+1	13	225	59.23
4	+1	73	+1	13	70	56.14
5	−1.41	30	0	10	270	60.13
6	+1.41	80	0	10	45	57.39
7	0	55	−1.41	5	150	57.35
8	0	55	+1.41	15	90	60.47
9	0	55	0	10	150	57.55
10	0	55	0	10	120	57.35
11	0	55	0	10	125	57.50

## 2.6. Incubation time

Once the optimal hydration conditions were determined, the soybeans were subjected to a several-hour incubation step in order to attain maximum hydrolysis of each glucoside to its corresponding aglycone by endogenous  $\beta$ -glucosidases. The incubation step consisted of simply holding the soybeans under the mild-heat hydrating conditions using the best temperature and rotation speed for times of up to 12 h. Longer incubation times were not recommendable due to fermentation and alteration of the sensory attributes.

## 2.7. Thermal treatment (TT) and storage

Once hydrated under the selected conditions, the soybeans were incubated for different times, removed from the basket and then thermally treated (TT) at  $1 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$  to achieve the desired degree of cooking (texture, taste, color; data not shown). The time beyond which negative effects started to impinge on the sensory properties of the beans was determined experimentally to be 5 min and, therefore, this became the duration of the TT. At the end of the TT, the beans were cooled, frozen, packaged in flexible polyethylene bags and stored at  $-20^\circ\text{C}$ .

## 2.8. Sample preparation and isoflavone extraction for analysis

Sample preparation consisted of reducing particle size on a food processor (HC31, Black & Decker, Baltimore, USA), and performing two sequential extractions of isoflavones in an ultrasonic bath (model 2210R – MTH, Branson, Danbury, USA) using the method developed by Rostagno, Palma, and Barroso (2003). The extraction was carried out in two stages: In the first stage, a sample of approximately 2.5 g was extracted by shaking with 20 mL of a mixture of ethanol and water (70% v/v), at  $60^\circ\text{C}$  for 50 min. After this, the sample was held at room temperature for 50 min, then, filtered and the volume measured. In the second stage, the solid residue from the first extraction was submitted to a new extraction using 10 mL of the same solvent as above for additional 30 min at  $60^\circ\text{C}$ , and allowed to stand at room temperature for

30 min. After filtration and measurement of the volume, the two extracts were combined, and an aliquot transferred to an HPLC vial using a filter syringe (Chromafil Xtra,  $0.20 \mu\text{m}$ , 25 mm, nylon, Macherey-Nagel, Düren, Germany).

## 2.9. High performance liquid chromatography (HPLC)

Analysis of the soybean isoflavone mixture was performed in an Agilent 1100 HPLC system, equipped with a diode array detector (Manchón et al., 2010) and a fused-core  $\text{C}_{18}$  column (Kinetex,  $100 \times 4.6 \text{ mm}$ ,  $2.7 \mu\text{m}$ , Phenomenex, Torrance, CA, USA, at  $50^\circ\text{C}$ ). The mobile phase consisted of: 0.1% acetic acid (solvent A) and acetonitrile with 0.1% acetic acid (solvent B), with the following gradient: 0 min, 8% B; 1.04 min, 15% B; 3.56 min, 17% B; 4.56 min 19.2% B, 5.50 min, 50% B; 6.50 min 100% B, 7.50 min 100% B; 8.50 min 8% B. The gradient included 1 min for column clean-up and one minute to return to the initial conditions. The mobile phase flow-rate was maintained at  $2.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  and the conditioning time between runs, at 3 min. The absorbance was monitored between 200 and 600 nm and the isoflavone peaks were integrated at 254 nm. The isoflavones present in the extracts were identified based on comparison of the retention times with those of authentic standards, the relative elution order of the reference method, and on the UV spectra of resolved compounds. Quantitation of glucosides and aglycone isoflavones was done by using the calibration curves of standards (5 points between 0.1 and  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) while malonyl and acetyl isoflavones [malonyl daidzin (MDi), malonyl glycitin (MGly), malonyl genistin (MGi) and acetyl genistin (AGi)] were quantified using the calibration curve of the respective glucosides and corrected by the molar extinction coefficient (Rostagno et al., 2010). Isoflavone concentration data was processed using Excel 2010 software (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Typical LODs varied from  $0.02 \mu\text{mol} \cdot 10^{-2} \text{ g}^{-1}$  for daidzein to  $0.01 \mu\text{mol} \cdot 10^{-2} \text{ g}^{-1}$  for genistein. Similarly, LOQ ranged from  $0.07 \mu\text{mol} / 100 \text{ g}$  for daidzein, and 0.04 for genistein. Operational concentrations were always kept securely above LOQs, so as to guarantee the linearity and precision practiced in previous work (Rostagno et al., 2010). Actual chromatograms in supplementary Fig. 2.

## 2.10. Statistical methods and analyses

Moisture uptake and the effect of time, temperature and speed of rotation of the drum on the isoflavone profile variation were studied by the surface-response methodology as described by Rodrigues and Iemma (2014), and the data analyzed by the on-line Protimiza Experiment Design Software (<http://experimental-design.protimiza.com.br>). The significance of the model was tested by ANOVA (Supplementary Table 1A, B).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Optimizing the controlled hydration process (CHP)

Controlled hydration process (CHP) trials were performed following the experimental design at the different temperatures ( $30$ – $80^\circ\text{C}$ ) and speeds ( $5$ – $15 \text{ rpm}$ ) in order for the grains to absorb the predetermined  $V_{\text{eff}}$ . As could be expected, the temperature of hydration had a greater influence on the time of hydration than the rotating speed of the drum (Fig. 2). Hydration times of less than 60 min could be obtained at  $80^\circ\text{C}$  and rotation speeds between 10 and 15 rpm (data not shown), but although hydration times could be reduced further by increasing the temperature, this parameter was kept as low as possible for the sake of obtaining higher aglycone yields at the hydration step.

The time required for the  $V_{\text{eff}}$  to be absorbed throughout the entire set of conditions ranged from 45 min ( $80^\circ\text{C}$ , 10 rpm) to 270 min ( $30^\circ\text{C}$ , 10 rpm). The process increased the moisture content of the raw material from the initial 8.59 to between 57.35 and 60.47%, remaining as such



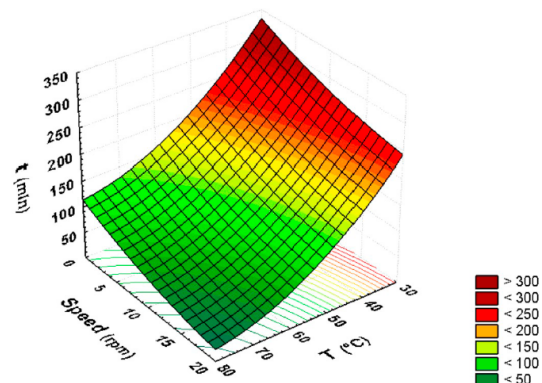


Fig. 2. Variation of the time needed for the beans to absorb the effective volume ( $V_{\text{eff}}$ ) as a function of both temperature and speed of rotation of the basket. Values were obtained following the experimental design set forth in Tables 1 and 2.

throughout the entire process. Temperatures above 55 °C, at speeds between 10 and 15 rpm, resulted in hydration times lower than 60 min, while temperatures below 55 °C required up to 200 min or more to complete the hydration process. These results are of significance from the standpoint of process efficiency, particularly for an industrial scale production due to throughput, space, energy water requirements and overall cost considerations.

The evolution of the total isoflavone and the most common individual species of isoflavone contents in samples of soybeans along incubation and incubation showed the progressive decrease of the conjugated and glycosylated forms, contrasting with commensurate increases of the aglycone forms and daidzein in particular. The additional effect of a finishing thermal treatment could also be observed in the isoflavone variations (Fig. 2). The isoflavone concentrations in the starting material were ( $\mu\text{mol}\cdot 10^{-2}\text{g}^{-1}$ ): malonylgenistin (78), genistin (47), malonyldaidzin (29), glycitin (9), malonylglycitin (8), daidzin (4), genistein (2.9), daidzein (0.12), glycitein (0.67) and acetylgenistin (0.06). Glucosides were the main ( $917.13\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) and the aglycones the least abundant ( $10.23\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) chemical species. Relative standard deviations for all isoflavones were lower than 4.34%.

As pointed out by Rostagno et al. (2009), temperature was likely to be the most influential determinant of the concentration of total glycosides. Although glucosidase activity was not determined here, it was reasonable to expect that the transformation of isoflavone conjugates to aglycones during the controlled hydration process occurred by endogenous  $\beta$ -glucosidases. Therefore, optimal temperature at the rate of hydration selected from the statistical planning must have been responsible for maximizing all: enzyme efficiency, substrate accessibility and hydrolysis.

### 3.2. Optimizing the incubation time (IT)

Once the best controlled hydration conditions were identified, the effect of an incubation step on the hydrolysis of glucosides was evaluated. Therefore, the effect of the incubation time (IT) on the isoflavone profile after the optimized controlled hydration process, prior to any thermal treatment, was monitored over a 12-h period (Fig. 3).

Furthermore, as IT was increased, any increase in the amount of aglycones was obviously the result of extending the time of exposure of the glycosidic substrates to the endogenous soybean  $\beta$ -glucosidases, until a plateau was reached at about 12 h. At this point, the total amount of aglycone species attained the value of  $247.96\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , while glucosides were reaching their lowest ( $450.42\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), meaning that

approximately 51% of the original isoflavone glycosides were converted to their respective aglycone forms (data not shown).

As for the genistein derivatives, a reduction in the amount of malonyl-genistin (from  $383.01$  to  $168.18\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) was observed after 12 h of incubation, although without a corresponding increase in the amount of genistin. This event suggested that the conjugate could have been directly converted to an aglycone. Consequently, and in register with the observation above, the amount of genistein increased from  $8.03$  to  $66.82\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ .

In the case of daidzein and its derivatives, a significant reduction in the amount of malonyl-daidzein was also observed when the IT was increased from 2 to 12 h. Again, the data suggest that the extra time of hydrolysis during incubation permitted the simultaneous conversion of the malonyl conjugate to the glucoside, followed by conversion of the latter to its aglycone. A substantial time-dependent increase of daidzein occurred in comparison with the other aglycones. After 12 h of incubation the amount of daidzein grew from  $0.12$  to  $63.10\mu\text{mol}\cdot 10^{-2}\text{g}^{-1}$ .

### 3.3. The additional effect of thermal treatment (TT)

Samples that had undergone the CHP and incubation for 2 to 12 h, were then submitted to a pre-cooking step (TT) consisting of autoclaving at 120 °C for 5 min. This step resulted in additional increases of the three aglycones, as seen in Fig. 4. It is worthwhile to highlight the outstanding increases of daidzein because this particular aglycone is the one reported to be a precursor of (S)-equol (Setchell et al., 2005), a microbiota metabolite with physiological action in humans. Its molar concentration at the end of the TT rose 593-fold (from  $0.12\mu\text{mol}\cdot 10^{-2}\text{g}^{-1}$  in the raw material, to  $71.16\mu\text{mol}\cdot 10^{-2}\text{g}^{-1}$ ).

In general, one impact of the TT was to further increase the final concentrations of total aglycones of the incubated intermediate product by an average of 14%; broken down as 36.6% for glycitein, in addition to 12.7 and 10.9% for daidzein and genistein, respectively. As could be expected, such increases were accompanied by commensurate decreases of the corresponding malonyl conjugates and glucosides. Other studies have suggested that the conversion of malonyl glucosides to their respective glucosides can proceed at the temperatures used in the TT, in agreement with our results. The modest effect the TT on the conversion of glucosides to aglycone forms may be due to the relatively low temperature used (120 °C). Evidence exists showing that temperatures higher than 150 °C would be required for a more extensive hydrolysis of the glucosides (Rostagno et al., 2004).

Finally, it should be emphasized that the increase in the amount of daidzein that could not be explained by the direct hydrolytic conversion of both daidzin and malonyl-daidzin to the aglycone ( $63.10\mu\text{mol}\cdot 10^{-2}\text{g}^{-1}$ ) at the end of the IT, or  $71.16\mu\text{mol}\cdot 10^{-2}\text{g}^{-1}$  at the end of the TT, could be explained by the action of specific endogenous hydroxylases. Reactions leading to simultaneous interconversions of genistin into daidzin, and followed by hydrolysis to daidzein, have been reported to occur in soybeans (Artigot, Baes, Daydé, & Berger, 2013; Barnes, 2010; Dixon & Steele, 1999; Hakamatsuka, Mori, Ishida, Ebizuka, & Sankawa, 1998; Latunde-Dada et al., 2001).

In support of this interpretation, there is the fact that the original molar sum-total of all genistein-moiety-containing forms ( $121.26\mu\text{mol}\cdot 10^{-2}\text{g}^{-1}$ ) could for the most part explain the final sum-total of all the genistein-containing forms ( $90.75\mu\text{mol}\cdot 10^{-2}\text{g}^{-1}$ ) plus the unexplained daidzein-moiety-containing forms ( $37.37\mu\text{mol}\cdot 10^{-2}\text{g}^{-1}$ ). The difference between these two sources ( $6.86\mu\text{mol}\cdot 10^{-2}\text{g}^{-1}$ ) could be accounted for by another source or by eventual minimal losses.

### 3.4. Isoflavone retention

Another major advantage of controlling the hydration process has been to allow the retention of bioconverted aglycone products while

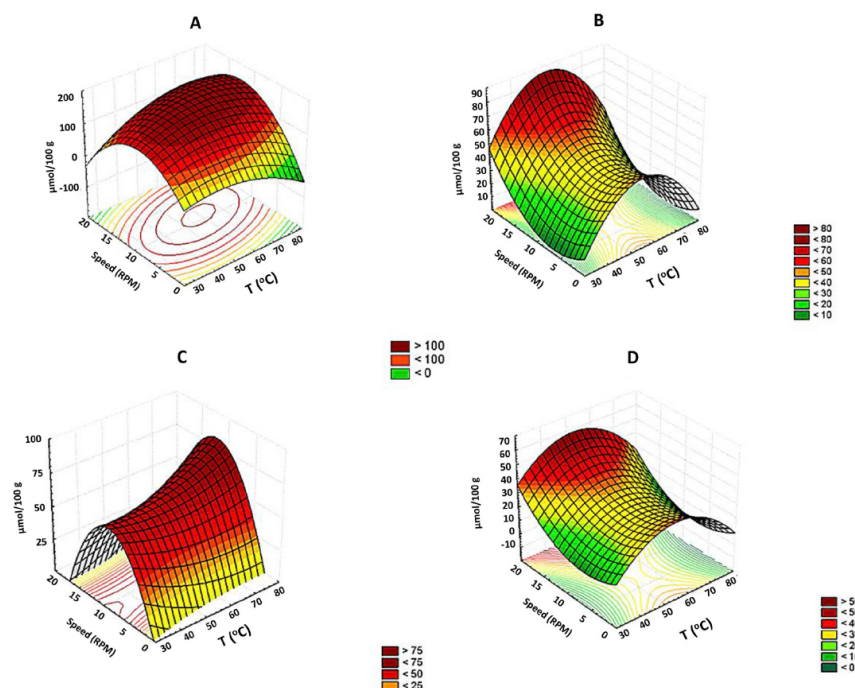


Fig. 3. Dependence of the most relevant isoflavone bioconversion from the independent variables, speed of rotation of the basket and water of hydration temperature during the hydration step. Total isoflavone (A), total glucoside (B), total aglycone (C) and free daidzein (D) yields as functions of the basket speed of rotation and water temperature. Values were obtained following the experimental design set forth in Tables 1 and 2.

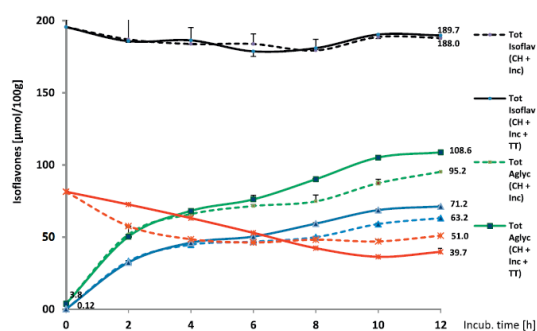


Fig. 4. Variation of the isoflavone profiles of soybeans as a function of incubation time beginning immediately after completion of the controlled hydration step. The top two lines (one dashed, one solid) represent the sum-total of all the isoflavone forms at every time point of incubation; the dashed line corresponding to the sum-total without thermal treatment (TT) and the solid line, with TT. Analogously, the lower sets of lines correspond to most relevant isoflavones forms (total glucosides, total aglycones and daidzein). Values were obtained following the experimental design set forth in Tables 1 and 2.

endogenous enzyme events are still in progress; something that becomes evident by inspecting the near molar constancy of total isoflavones. As opposed to the conventional static immersion or soaking approach, the seeds here were evenly exposed to limited (effectively absorbable) amounts of water and, in a stepwise manner; the moisture being allowed to diffuse radially inwards driven by a moisture concentration gradient. Once the swelling equilibrium was nearly reached,

the seeds were denied further exposure to external water in order to avoid back diffusion and thus the loss of soluble material, while still allowing prolonged enzyme action.

#### 4. Conclusions

The process here presented allowed the production of cooked soybeans with high amounts of biologically active isoflavone aglycones without the need to disintegrate the seed or using exogenous enzymes. By using the combination of a controlled hydration process at optimal conditions (54 °C/15 rpm/60 min) and an incubation step, immediately followed by heat treatment, it was possible to increase the amount of aglycone isoflavones from initial 3.76 to the endpoint of 108.55  $\mu\text{mol} \cdot 10^{-2} \text{g}^{-1}$ , representing a 28.9-fold increase, or to convert approximately 52% of the over-all glycosidic forms to aglycones. The final thermal treatment was still responsible for an additional average increase of 14% over the gain obtained at the end of the incubation step. It was worthy of notice the outstanding increment that the process brought on the final levels of biologically important daidzein, raising its content to 593 times the original amount found in the raw beans. Moreover, observing the relative constancy of the total amounts of isoflavones throughout the process, it became evident that losses were negligible. The controlled hydration process is based on the strategy of avoiding losses once the absorbed moisture driven by a concentration gradient reaches a point of equilibrium, thus maintaining the proper enzyme-substrate distances for a non-random collision mechanistic enzyme action, and also avoiding the back diffusion and leaching of products.

## Acknowledgements

The authors acknowledge: a) the financial support of the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (The São Paulo Research Foundation, FAPESP) Projects 2013/04304-4, PIPE 2012/51521-8 and PIPE 2016/50228-8), b) the gift of the agronomic material by the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa), Londrina, PR, Brazil and c) the scholarship granted to FSR by the Coordenadoria de Aperfeiçoamento da Educação Superior (CAPES).

## Conflicts of interest

Authors MAR and JA-F declare to have no conflicts of interest. Author FSR is proprietor of a consulting company in the food technology area. A patent request for the invention has been deposited by authors FSR and JA-F.

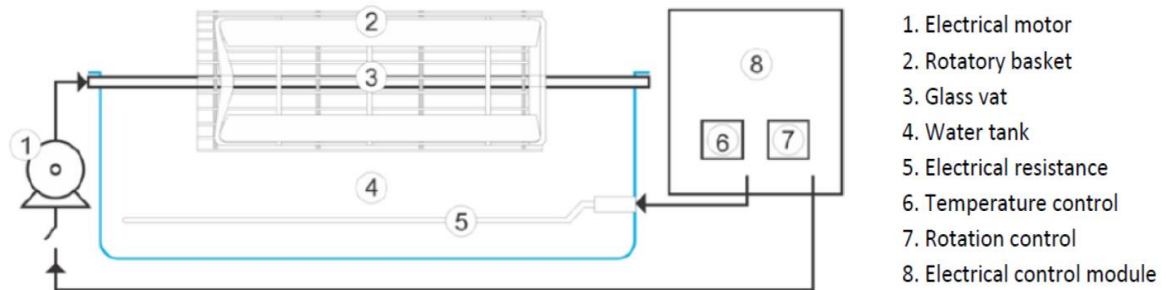
## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.040>.

## References

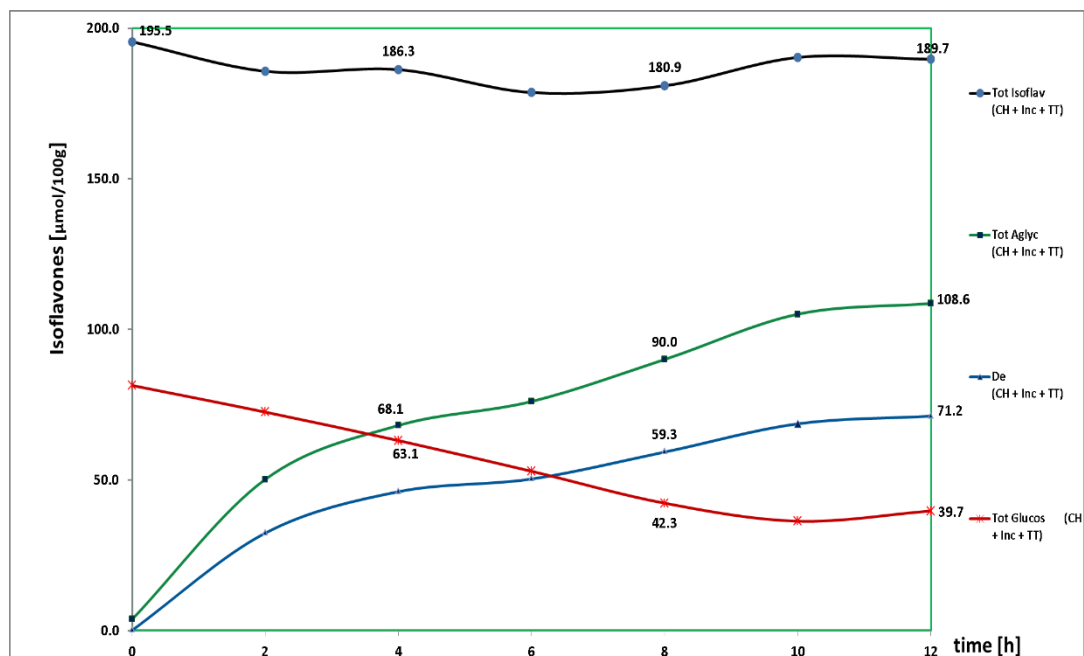
- Artigot, M.-P., Baes, M., Daydé, J., & Berger, M. (2013). Expression of flavonoid 6-hydroxylase candidate genes in normal and mutant soybean genotypes for glycitein content. *Molecular Biology Reports*, 40(7), 4361–4369.
- Banerjee, S., Li, Y., Wang, Z., & Sarkar, F. H. (2008). Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Letters*, 269(2), 226–242.
- Barnes, S. (2010). The biochemistry, chemistry and physiology of the isoflavones in soybeans and their food products. *Lymphatic Research and Biology*, 8(1), 89–98.
- Curtis, P. J., Sampson, M., Potter, J., Dhathariya, K., Kroon, P. A., & Cassidy, A. (2012). Chronic ingestion of flavan-3-ols and isoflavones improves insulin sensitivity and lipoprotein status and attenuates estimated 10-year CVD risk in medicated postmenopausal women with type 2 diabetes a 1-year, double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Care*, 35(2), 226–232.
- Dixon, R. A., & Steele, C. L. (1999). Flavonoids and isoflavonoids—a gold mine for metabolic engineering. *Trends in Plant Science*, 4(10), 394–400.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, & Embrapa Soja Londrina – PR <https://www.embrapa.br/soja/>, Accessed date: 20 June 2016.
- Góes-Favoni, S. P., Carrão-Panizzi, M. C., & Beleia, A. (2010). Changes of isoflavone in soybean cotyledons soaked in different volumes of water. *Food Chemistry*, 119(4), 1605–1612.
- Hakamatsuka, T., Mori, K., Ishida, S., Ebizuka, Y., & Sankawa, U. (1998). Purification of 2-hydroxyisoflavanone dehydratase from the cell cultures of *Pueraria lobata* in honour of professor GH Neil Towers 75th birthday. *Phytochemistry*, 49(2), 497–505.
- Latunde-Dada, A. O., Cabello-Hurtado, F., Czitttrich, N., Didierjean, L., Schopfer, C., Hertkorn, N., & Ebel, J. (2001). Flavonoid 6-hydroxylase from soybean (*Glycine max* L.), a novel plant p-450 monooxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(3), 1688–1695.
- Lee, M. M., Gomez, S. L., Chang, J. S., Wey, M., Wang, R.-T., & Hsing, A. W. (2003). Soy and isoflavone consumption in relation to prostate cancer risk in China. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 12(7), 665–668.
- Liu, X., Li, S., Chen, J., Sun, K., Wang, X., Wang, X., & Hui, R. (2012). Effect of soy isoflavones on blood pressure: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 22(6), 463–470.
- Manchón, N., D'Arrigo, M., García-Lafuente, A., Guillaumon, E., Villares, A., Ramos, A., ... Rostagno, M. (2010). Fast analysis of isoflavones by high-performance liquid chromatography using a column packed with fused-core particles. *Talanta*, 82(5), 1986–1994.
- Messina, M. (2014). Soy foods, isoflavones, and the health of postmenopausal women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 100(Supplement 1), 423S–430S.
- Okabe, Y., Shimazu, T., & Tanimoto, H. (2011). Higher bioavailability of isoflavones after a single ingestion of aglycone-rich fermented soybeans compared with glucoside-rich non-fermented soybeans in Japanese postmenopausal women. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(4), 658–663.
- Rodrigues, M. I., & Iemma, A. F. (2014). *Experimental Design and Process Optimization*. New York: CRC Press.
- Rostagno, M., Manchon, N., Guillaumon, E., García-Lafuente, A., Villares, A., & Martínez, J. (2010). Methods and techniques for the analysis of isoflavones in foods. *Chromatography Types, Techniques and Methods* (pp. 157–198). New York: Nova Science publishers Inc, Hauppauge.
- Rostagno, M., Palma, M., & Barroso, C. (2004). Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans. *Analytica Chimica Acta*, 522(2), 169–177.
- Rostagno, M., Villares, A., Guillaumon, E., García-Lafuente, A., & Martínez, J. (2009). Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. *Journal of Chromatography A*, 1216(1), 2–29.
- Rostagno, M. A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*, 1012(2), 119–128.
- Setchell, K. D., Clerici, C., Lephart, E. D., Cole, S. J., Heenan, C., Castellani, D., ... Heubi, J. E. (2005). S-equol, a potent ligand for estrogen receptor  $\beta$ , is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(5), 1072–1079.
- Steiner, C., Arnould, S., Scalbert, A., & Manach, C. (2008). Isoflavones and the prevention of breast and prostate cancer: New perspectives opened by nutrigenomics. *British Journal of Nutrition*, 99(E-S1), ES78–ES108.
- Tipkanon, S., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V., Suwonsichon, T., Prinyawiwatkul, W., & Xu, Z. (2010). Optimizing time and temperature of enzymatic conversion of isoflavone glucosides to aglycones in soy germ flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(21), 11340–11345.
- Villares, A., Rostagno, M. A., García-Lafuente, A., Guillaumon, E., & Martínez, J. A. (2011). Content and profile of isoflavones in soy-based foods as a function of the production process. *Food and Bioprocess Technology*, 4(1), 27–38.
- Vitale, D. C., Piazza, C., Melilli, B., Drago, F., & Salomone, S. (2013). Isoflavones: Estrogenic activity, biological effect and bioavailability. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 38(1), 15–25.
- Wang, H.-J., & Murphy, P. A. (1996). Mass balance study of isoflavones during soybean processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(8), 2377–2383.
- Yerramsetty, V., Gallaher, D. D., & Ismail, B. (2014). Malonylglucoside conjugates of isoflavones are much less bioavailable compared with unconjugated  $\beta$ -glucosidic forms in rats. *The Journal of Nutrition*, 144(5), 631–637.
- Yonemoto-Yano, H., Maebuchi, M., Fukui, K., Tsuzaki, S., Takamatsu, K., & Uehara, M. (2014). Malonyl isoflavone glucosides are chiefly hydrolyzed and absorbed in the colon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(10), 2264–2270.

**Supplementary figure 1.** Schematic representation of the Controlled-Hydration Processor (CHP)



### Highlights

- Limited hydration allows more effective isoflavone bioconversion in soybeans
- Controlled hydration obviates using exogenous enzymes to produce aglycone isoflavones
- Controlling hydration of the soybean will avoid leaching of soluble grain components
- Controlled hydration of beans should reduce water expenditure during processing
- Nutrification of grains could be done using the principle of controlled hydration



**Graphical abstract**

**CAPÍTULO 3 – Accelerated Bioconversion of Isoflavones in Whole Soybean using  
Controlled Hydration and Thermal Treatment**

Franz R. Salces, Maurício A. Rostagno and Jaime Amaya-Farfan.



Elsevier Editorial System(tm) for LWT - Food  
Science and Technology  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Accelerated Bioconversion of Isoflavones in Whole Soybeans using  
Controlled Hydration and Thermal Treatment

Article Type: Short communication

Keywords: Thermal hydrolysis  
Bioactives  
Convenience foods  
 $\beta$ -Glucosidase  
Dehydration

Corresponding Author: Professor Jaime Amaya-Farfan, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Unicamp

First Author: Franz R Salces, MSc

Order of Authors: Franz R Salces, MSc; Mauricio A Rostagno, PhD; Jaime  
Amaya-Farfan, Ph.D

Abstract: The cooking method may be the cause of low aglycone isoflavone recovery in legumes. Immediately after hydration by a new controlled process, whole soybeans were pre-cooked at 105, 115, 121 and 134 °C, and the effect of the heat treatments on the isoflavone profile evaluated by HPLC. Owing to the water-restricting conditions during the hydration process, the heat treatment increased the isoflavone bioconversion to total aglycones by 250% (from 51.8 in the control-hydrated bean to 131.8  $\mu\text{mol}/100\text{g}$  in the product heated at 134 °C), thus opening the possibility of substituting a 12-hour incubation step for a direct 5-minute thermal treatment. The evolution of daidzein and genistein, two aglycones which are important indicators of soy functional quality, showed a response imitative of the total aglycones generated. Daidzein increased substantially from 33.3 in the hydrated material to 69.2  $\mu\text{mol}/100\text{g}$  and genistein, from 4.4 to 53  $\mu\text{mol}/100\text{g}$ . Precooking of whole soybeans could be accomplished with substantial increases of isoflavone aglycones by further simplifying a recently proposed method if a heat treatment at a temperature between 105 and 134 °C is applied immediately after the controlled-hydration step. Since grain discoloration occurs at the highest temperature, 105 or 125 °C appear as interesting options.

Suggested Reviewers: Ana Lante Ph.D.

Faculty member, Department of Agronomy, Food, Natural Resources, Animals  
& Environment, University of Padova, Viale dell'Università 16, 35020,  
Legnaro, PD, Italy  
anna.lante@unipd.it  
Has coauthored publications in the area of isoflavones

MARIO A da CUNHA Ph.D.

Faculty member, Chemistry Dept, Univ Tecnol Fed Parana, Via  
Conhecimento, Km 01, BR-85503390 Pato Branco, PR, Brazil  
mcunha@utfpr.edu.br

Specialist in soybean processing

DIANA Di GIOIA Ph.D.

Professor, Dept Agr Sci, Alma Mater Studiorum Univ Bologna, I-40127  
Bologna, Italy

diana.digioia@unibo.it

Knowledge in isoflavone in grains

#### Cover Letter

Professor

Rakesh K. Singh

Editor-in-Chief, LWT- Food Science and Technology

Dear Professor Singh,

On behalf of the authors, I hereby submit the manuscript titled

#### **Accelerated Bioconversion of Isoflavones in Whole Soybeans using Controlled Hydration and Thermal Treatment**

---

By Franz R. Salces, Mauricio A. Rostagno and Jaime Amaya-Farfan,

for your evaluation seeking its publication in LWT- Food Science and Technology. This manuscript points out that by modifying a recently published new process of hydration of raw soybeans, which leads to high recoveries of isoflavone aglycones, should simplify even further the process resulting in a much more economical and accelerated way to bioconvert the native forms of these useful bioactives.

Due to simplicity, environmental friendliness and minimized technological manipulation, we believe the process should be attractive to food processors and its products to consumers.

The authors clarify that, although the hydration step has been published, it is such an essential basis to obtain the results claimed here that cannot be suppressed. We have been keen in avoiding crossovers with the previous paper, published at the end of last year. All three authors agreed that the manuscript be submitted to LWT- Food Science and Technology.

For the attention to this submission we thank you and remain

Sincerely yours,

Jaime Amaya-Farfan, Professor

School of Food Engineering, University of Campinas, Campinas, SP – Brazil

\*Highlights (for review)

#### Highlights

### Accelerated Bioconversion of Isoflavones in Whole Soybeans using Controlled Hydration and Thermal Treatment

---

Franz R. Salces<sup>a</sup>, Mauricio A. Rostagno<sup>b</sup> and Jaime Amaya-Farfan<sup>a\*</sup>

1. A rapid method to bioconvert 50% of soy isoflavones to aglycones
2. A strategy to increase endogenous enzyme activity during seed processing
3. Improved precooking of grains for high nutrient and bioactivity retention
4. Intelligent precooking of grains for high daidzein and genistein contents
5. Healthy and environmentally friendly processing of convenience-food grains

\*Manuscript

[Click here to view linked References](#)

## 1 Accelerated Bioconversion of Isoflavones in Whole Soybeans using 2 Controlled Hydration and Thermal Treatment

---

3 Franz R. Salces<sup>a</sup>, Mauricio A. Rostagno<sup>b</sup> and Jaime Amaya-Farfan<sup>a\*</sup>

4 <sup>a</sup> Food and Nutrition Graduate Program (PPGAN), School of Food Engineering (FEA), University  
5 of Campinas (UNICAMP), Rua Monteiro Lobato, 80, Campinas, SP 13083-862, Brazil.

6 <sup>b</sup> School of Applied Sciences (FCA), University of Campinas (UNICAMP); R. Pedro Zaccaria,  
7 1300 – P.O. Box 1068; ZIP code:13484-350; Limeira; São Paulo; Brazil; Phone: +55.19.(19)  
8 3701-6732; Fax: +55.19. 3701-6680;

9 \* Corresponding author e-mail: [jaf@unicamp.br](mailto:jaf@unicamp.br)

10 Running title: Accelerated bioconversion of aglycones in soybeans

### 11 Abstract

12 The cooking method may be the cause of low aglycone isoflavone recovery in legumes.  
13 Immediately after hydration by a new controlled process, whole soybeans were pre-cooked at  
14 105, 115, 121 and 134 °C, and the effect of the heat treatments on the isoflavone profile  
15 evaluated by HPLC. Owing to the water-restricting conditions during the hydration process, the  
16 heat treatment increased the isoflavone bioconversion to total aglycones by 250% (from 51.8 in  
17 the control-hydrated bean to 131.8 µmol/100g in the product heated at 134 °C), thus opening the  
18 possibility of substituting a 12-hour incubation step for a direct 5-minute thermal treatment. The  
19 evolution of daidzein and genistein, two aglycones which are important indicators of soy  
20 functional quality, showed a response imitative of the total aglycones generated. Daidzein  
21 increased substantially from 33.3 in the hydrated material to 69.2 µmol/100g and genistein,  
22 from 4.4 to 53 µmol/100g. Precooking of whole soybeans could be accomplished with  
23 substantial increases of isoflavone aglycones by further simplifying a recently proposed method  
24 if a heat treatment at a temperature between 105 and 134 °C is applied immediately after the  
25 controlled-hydration step. Since grain discoloration occurs at the highest temperature, 105 or  
26 125 °C appear as interesting options.

27 *Keywords: Thermal hydrolysis, Bioactives, Convenience foods,  $\beta$ -Glucosidase, Dehydration*

28

29

30

## 31 **1. Introduction**

32 In addition to the high protein and oil content, soybeans are a major source of vegetable  
33 isoflavones in nature, but this functional potential is not fully exploited in western nations  
34 especially because of eating habits and the large losses that occur during dry industrial  
35 processing, as well as some conventional processes. Regarding the processing methods,  
36 isoflavones are often eliminated by leaching together with other soluble solids of potential  
37 importance, approaching losses of over 50% (Wang & Murphy, 1996; Zaheer & Akhtar, 2017).

38 Another factor that contributes to the low accessibility of the population to isoflavones  
39 is the predominance in the grain of the non-bioavailable chemical forms, which are the  
40 glycosidic and conjugated forms (Okabe, Shimazu, & Tanimoto, 2011; Vitale, Piazza, Melilli,  
41 Drago, & Salomone, 2013; Yerramsetty, Gallaher, & Ismail, 2014; Yonemoto-Yano, Maebuchi,  
42 Fukui, Tsuzaki, Takamatsu & Uehara, 2014). Particularly the aglycone forms of genistin and  
43 daidzin, the forms of greatest interest to humans, are normally found in minimal amounts in the  
44 grain (Góes-Favoni, Beléia, Carrão-Panizzi & Mandarino, 2004).

45 The conversion of complex isoflavones to aglycones in the process of precooking whole  
46 soybeans occurs thanks to the activation of endoenzymes by heat, especially in the unit  
47 operations of hydration, incubation and cooking. At this step, maintaining a high rate of  
48 biotransformation and simultaneously avoiding losses of both precursors and products have  
49 remained as two technological hurdles (Wang & Murphy, 1996). It is important to note that  
50 retention of the total isoflavones should also contribute to greater synergism, but this is not what  
51 usually happens in conventional processes due to losses by leaching. Aware of the great losses



of soluble compounds during hydration, and that the most adequate concentration of moisture in the grain is of key importance, some researchers have suggested to reduce the volume of water of hydration (Góes-Favoni, Carrão-Panizzi, & Beleia, 2010; Rostagno, Villares, Guillaumon, Garcia-Lafuente, & Martinez, 2009; Tipkanon, Chompreeda, Haruthaithanasan, Suwonsichon, Prinyawiwatkul & Xu, 2010), but only with partial success. Since then, no new alternatives capable of avoiding the losses associated with the conventional processes have been proposed.

We have recently proposed, however, a new 2-h long process of hydration (CHP) by which the bean takes up only part of the hydration water in such a controlled fashion as to simultaneously avoid the loss of solids through leaching and allow bioconversion by judiciously allowing the activation and effective action of endogenous enzymes (Salces, Rostagno & Amaya-Farfan, 2018). In that study, the CHP at 54 °C yielded a hydrated product, which already exhibited partial but crucial isoflavone bioconversion. In order to further increase bioconversion, the step of hydration was followed by a 12-hour incubation step at the hydrating temperature of 54 °C; this incubation contributing with significant amounts of additional bioconversion. For the third and final step, the beans were transferred to an autoclave and thermally treated at 121 °C for 5 minutes, thereby gaining additional 14% of bioconversion.

Since the CHP permitted a strategic arrangement to both substrates and enzymes, we reasoned that the thermal treatment immediately following hydration might have a different result from that obtained when hydration is accomplished by the classical static method. Therefore, the present study had the purpose of evaluating the overall effect of modifying the above three-step process by combining the last two steps into a single operation; namely, going directly from step 1 (CHP) to the final thermal treatment. Evaluation was accomplished by simply monitoring the isoflavone profile at the end of treating whole beans at the temperature of either: 105, 115, 121 and 134 °C for five minutes.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Soybean sample

All the trials were carried out with soybeans (cultivar BRS 216) kindly donated by the Brazilian Agricultural Research Corporation – Embrapa. Upon arrival, the material had the water content determined in triplicate by drying at 105 °C to constant weight. The moisture content of the starting material was determined to be  $8.74 \pm 0.11\%$ .

### 2.2 Solvents and reagents

The isoflavone extraction was accomplished using analytical grade ethanol (Labsynth, Diadema, SP, Brazil). Acetonitrile (HPLC grade, from JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA) was the mobile phase for isoflavone analysis, and stock solutions of isoflavone standards were prepared in methanol HPLC grade, from Merck, Darmstadt, Germany. Ultra-pure water was obtained from a Milli-Q Advantage A10 water system (Millipore, Bedford, MA, USA). Isoflavone standards daidzin (Di), glycitin (Gly), genistin (Gi), daidzein (De), glycitein (Gle) and genistein (Ge) were purchased from LC Labs (Woburn, MA, USA), all showing a standard purity higher than 98%. Stock solutions of all standards were prepared in 80% methanol and stored at -20 °C until used for analysis.

### 2.3 Controlled Hydration equipment and processing (CH-Processor)

A 30-second clean-up rinse with cool water preceded hydration. The whole process took place in two steps: the controlled hydration and a 5-minute thermal treatment. The first step was accomplished in a CHP-rotator apparatus (previously described by Salces et al., 2018), which consisted of a rotating basket partially immersed in a pre-determined volume of hydration water, under controlled temperature and speed of rotation. The operating conditions of temperature and speed were set at 54 °C and 15 rpm, respectively. Once the effective volume ( $V_{eff}$ ) of water in the reservoir reached operating temperature, the hydration basket containing the mass of grains to be hydrated was put in contact with the water and there allowed to tumble until complete absorption (about two hours) of the  $V_{eff}$  occurred.

#### 104 2.4 Effective volume ( $V_{eff}$ ) and the controlled hydration process (CHP)

105 From the classical static hydration (total immersion or soaking) method in excess water  
106 at room temperature, it was known that the seeds absorb the maximum absorbable volume  
107 ( $V_{max}$ ), or approximately an equal mass to the soybean mass in a period of about 12 hours. The  
108 effective volume ( $V_{eff}$ ) was then defined as 85% of  $V_{max}$ , and the process for this first step was  
109 also described by Salces et al., 2018.

#### 110 2.5 Thermal Treatment

111 Immediately after hydration as described above, the soybeans were transferred to  
112 stainless wire trays forming 1-cm-thick slabs and autoclaved at one of the four pre-selected  
113 temperatures, namely: 105, 115, 121 and 134 °C for 5 minutes. Upon autoclaving, the beans  
114 were spread out and allowed to cool to room temperature. Linear interpolation was made for the  
115 temperature of  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  125 °C according to the relationship  $y = (33.1x - 2722)/13 = 108.89$   
116 ( $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ ). The processed beans were conditioned in flasks and stored at -20 °C until  
117 analysis.

#### 118 2.6 Isoflavone extraction and analysis

119 Samples went through a particle comminution step in a common food processor before  
120 proceeding to two sequential extractions of the isoflavones in an ultrasonic bath (model 2210R  
121 – MTH, Branson, Danbury, USA) following the procedure used by Rostagno, Palma & Barroso  
122 (2003). The extraction was accomplished in two steps: In the first step, a 2.5-g sample was  
123 extracted by shaking with 20 mL of a 70% (v/v) solution of ethanol and water, at 60 °C for 50  
124 min. The sample was left standing at room temperature for 50 minutes filtered and the volume  
125 saved. In the second step, the solid residue was reextracted with 10 mL of the same solution as  
126 above for additional 30 minutes at 60 °C, and allowed to stand at room temperature for another  
127 30 min. After filtration the two extracts were combined and the volume measured. Aliquots  
128 were transferred to HPLC vials using a filter syringe (Chromafil Xtra, 0.20  $\mu\text{m}$ , 25 mm, nylon,  
129 Macherey-Nagel, Düren, Germany).



## 2.7 HPLC analysis

Analytical determination of the soybean isoflavone profiles was accomplished in an Agilent 1100 HPLC system equipped with a diode array detector and a fused-core C<sub>18</sub> column (Kinetex, 100 x 4.6 mm, 2.7 µm, Phenomenex, Torrance, CA, USA, at 50 °C (Manchón, D'Arrigo, García-Lafuente, Guillamón, Villares, Ramos & Rostagno, 2010). Quantification of glucosides and aglycone isoflavones was done by using the calibration curves of standards (5 points between 0.1 and 100 mg.L<sup>-1</sup>) while malonyl and acetyl isoflavones [malonyl daidzin (MDi), malonyl glycitin (MGly), malonyl genistin (MGi) and acetyl genistin (AGi)] were quantified using the calibration curve of the corresponding glucosides and corrected by the molar extinction coefficient (Rostagno, Manchon, Guillamon, Garcia-Lafuente, Villares, & Martinez, 2010). Isoflavone concentration data was processed using Excel 2010 software (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

## 3. Results and Discussion

### 3.1 Changes in the isoflavone profiles

Modifications of isoflavone profiles during processing may occur due to both losses and transformations, but these factors may strongly depend on the method of hydration as suggested by the work of Salces et al., 2018. Wang & Murphy (1996), for instance, reported that significant losses of isoflavones occur during the manufacture of tempeh (12% during soaking of the beans, and 49% during the heat treatment). In the case of converting the dry beans into a flour prior to hydration, a similar problem may occur, as reported by Mukherjee, Chakraborty & Dutta (2019). These authors found that rehydration of the soybean flour may result in the loss of up to 90% of the total phenolic compounds. On the other hand, the same authors thought that alkaline hydrolysis was responsible for generating daidzein and genistein during alkaline extraction of a protein isolate.

For the present work, individual lots of soybeans were hydrated in the controlled fashion recommended by Salces et al., 2018, and subsequently submitted to a 5-minute thermal treatment at each of the four selected temperatures immediately following hydration. Chromatographic determination of the main isoflavone forms extracted generated the profile depicted in Figure 1.

As expected, the raw material (Figure 1B) showed high contents of glucosides (peaks 1, 2 and 3) and low contents of aglycones (peaks 7, 8 and 10). On the other hand, the lots that were treated at 134 °C (Figure 1C), exhibited reductions of malonyl conjugates (peaks 4,5 and 6), increases of glucosides and substantial increases of aglycones. It was interesting to observe the increase of the acetylgenistin peak (9), which has also been reported to occur under dry heat (Chien, Hsieh, Kao & Chien, 2005).

*Insert Fig 1 about here*

**Figure 1.** Illustration of the chromatographic changes occurring in the main-isoflavone profiles of a thermally treated soybean lot immediately after undergoing controlled hydration. A) Array of standards; B) Raw material; C) Profile of product thermally treated at 134 °C (Peak identification: 1, 2 and 3 are Di, Gli and Gi, respectively; 7, 8 and 10 are De, Gle, Ge, respectively; 9 is MG).

*Insert Fig 2 about here*

**Figure 2.** Influence of the temperature of thermal treatment of mature whole soybeans on the degree of bioconversion among isoflavones. Immediately after hydration, each lot was autoclaved at the stipulated temperature and the isoflavone profile determined (dry basis).

180

181           Figure 2 shows the substantial increases of total glucosides and total aglycones  
 182 simultaneously occurring during the initial 2-hour controlled hydration at the temperature of  
 183 optimal activity of the endogenous  $\beta$ -glucosidase (54 °C). Beyond this point, the effects of  
 184 single thermal treatments at 105, 115, 121 and 134 °C can be observed. Scanning through, a  
 185 rather flat response to the action of temperatures above 115 is perceived until the final climb to  
 186 134 °C is reached. Therefore, autoclaving at 105 °C could be an attractive alternative if  
 187 aglycone-rich whole soybean products such as salad ingredients were desired. Autoclaving at  
 188 105 °C raised the total aglycone content by 90% (from 51.8 to 98.9  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ , or to nearly  
 189 75% of the total attainable at 134 °C), whereas daidzein grew from 33.3 to 60.7  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  (or  
 190 58% (76%) of the maximum attainable at 134 °C), and genistein, from 31.8 to 53.1  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$   
 191 (or 59.9% of the maximum attainable at 134 °C). Glycitein, the smallest component, reached 6.5  
 192  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ , or 68% of the maximum attainable at 134 °C. Furthermore, since obtaining the  
 193 highest yield of aglycones by autoclaving at 134 °C would result in a brownish-colored product,  
 194 a suggestion is to autoclave at the interpolated temperature of 125 °C. At this temperature, the  
 195 beans will still have the natural appearance of beans autoclaved at 121 °C, and the aglycone  
 196 yields should be closer to those obtained at the end of the 3-step method of Salces et al., 2018.  
 197 Interpolation for such a 13-degree interval can be accomplished linearly as mentioned in the  
 198 experimental section.

199           Commenting on the lower initial level of total isoflavones found in the raw beans at the  
 200 just-hydrated state, we have found no explanation to this outcome other than being the result of  
 201 incomplete extractions prior to the high temperature treatment. Finally, regarding the total  
 202 glucoside increase at 115 and 121 °C, likewise we should consider the possibility of reverse  
 203 bioconversions as a result of these particular temperatures on the special array of precursors and  
 204 end products generated during the controlled hydration.

It is also pertinent to emphasize here the timely importance of reducing the number of steps necessary to achieve any targeted final food product simultaneously with the retention of the maximum number of health-positive attributes. In that sense, pre-processing products with minimal manipulation and having a wide range of applications is always a desirable option. Hydration of mature soybeans in a controlled fashion prior to precooking a consumer or industrial product, will offer the advantage of full nutrient retention in addition to the possibility of simultaneously infusing a variety of specific nutrients or additives, as suggested by Salces et al., 2018.

## Conclusions

Significant hydrolysis and bioconversion of isoflavones occurred when the control-hydrated soybeans were thermally treated at each of the four temperatures selected (105, 115, 121 and 134 °C). At the lowest temperature (105 °C) the total aglycone yield increased to 98.9 µmol/100g, or 75% of the total aglycone yield at 134 °C. In turn, daidzein alone accounted for 87.7 and genistein, to 68% of the total attainable at 134 °C. Such large bioconversion, signifying 58% of the total isoflavone content of the bean, is thought to be mainly the result of the controlled hydration undergone by the raw material prior to autoclaving, thus appearing that the CHP works as an adequate and sensible activation step to make thermal bioconversion more effective than it has been in the past by the classical soaking method. Treating control-hydrated soybeans at 125 °C for 5-minutes could substitute the 3-step process that includes a 12-h incubation step offering equivalent bioconversion values. Controlled-hydration during whole-grain pre-processing may be preferable to soaking the beans or the flours whenever more effective endogenous enzymatic transformations, higher recovery of soluble components, and environmentally friendlier or more cost-effective processes are desired.

## Acknowledgments



231 The authors acknowledge: a) the financial support of The São Paulo State Research Foundation,  
 232 FAPESP to FSR; Projects 2013/04304-4, PIPE 2012/51521-8 and PIPE 2016/50228-8), b) the  
 233 gift of the agronomic material by Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Soja,  
 234 Londrina – PR, and c) the scholarship grant 001 to FSR by Coordenadoria de Aperfeiçoamento  
 235 da Educação Superior (CAPES).

## 236 Conflicts of Interest

237 Authors MAR and JA-F declare to have no conflicts of interest. Author FSR is proprietor of a  
 238 consulting company in the food technology area.

## 239 References

- 240 Chien, J. T., Hsieh, H. C., Kao, T. H., & Chien, B. H. (2005). Kinetic model for studying the  
 241 conversion and degradation of isoflavones during heating. *Food Chemistry*, 91, 425-434.  
 242 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Soja Londrina – PR  
 243 <https://www.embrapa.br/soja>  
 244 Góes-Favoni, S. P., Carrão-Panizzi, M. C., & Beleia, A. (2010). Changes of isoflavone in  
 245 soybean cotyledons soaked in different volumes of water. *Food Chemistry*, 119(4),  
 246 1605-1612.  
 247 Góes-Favoni, S. P., Beléia, A. D. P., Carrão-Panizzi, M. C. & Mandarino, J. M. G., (2004).  
 248 Isoflavones em produtos comerciais de soja. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 24,  
 249 582-586.  
 250 Manchón, N., D'Arrigo, M., García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Ramos, A.  
 251 Martínez, Rostagno, M. A. (2010). Fast analysis of isoflavones by high-performance  
 252 liquid chromatography using a column packed with fused-core particles. *Talanta*, 82(5),  
 253 1986-1994.  
 254 Mukherjee, R., Chakraborty, R., & Dutta, A. (2019) Soaking of soybean meal: evaluation of  
 255 physicochemical properties and kinetic studies. *Journal of Food Measurement and*  
 256 *Characterization*, 13:390–403.  
 257 Okabe, Y., Shimazu, T., & Tanimoto, H. (2011). Higher bioavailability of isoflavones after a  
 258 single ingestion of aglycone-rich fermented soybeans compared with glucoside-rich  
 259 non-fermented soybeans in Japanese postmenopausal women. *Journal of the Science of*  
 260 *Food and Agriculture*, 91(4), 658-663.  
 261 Rostagno, M., Manchon, N., Guillamon, E., Garcia-Lafuente, A., Villares, A., & Martinez, J.  
 262 (2010). Methods and techniques for the analysis of isoflavones in foods.  
 263 *Chromatography Types, Techniques and Methods*. Nova Science Publishers Inc,  
 264 Hauppauge, New York, 157-198.  
 265 Rostagno, M., Villares, A., Guillamon, E., Garcia-Lafuente, A., & Martinez, J. (2009). Sample  
 266 preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. *Journal of*  
 267 *Chromatography A*, 1216(1), 2-29.  
 268 Rostagno, M., Palma, M., & Barroso, C. (2004). Pressurized liquid extraction of isoflavones  
 269 from soybeans. *Analytica Chimica Acta*, 522(2), 169-177.  
 270 Rostagno, M. A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy  
 271 isoflavones. *Journal of Chromatography A*, 1012(2), 119-128.

- 272 Salces, F. R., Rostagno M. A. & Amaya-Farfan, J. (2018). Novel Process of Hydration,  
273 Followed by Thermal Treatment, for High Isoflavone Bioconversion in Soybeans.  
274 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.040>
- 275 Tipkanon, S., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V., Surwonsichon, T., Prinyawiwatkul, W., &  
276 Xu, Z. (2010). Optimizing time and temperature of enzymatic conversion of isoflavone  
277 glucosides to aglycones in soy germ flour. *Journal of agricultural and food chemistry*,  
278 58(21), 11340-11345.
- 279 Vitale, D. C., Piazza, C., Melilli, B., Drago, F., & Salomone, S. (2013). Isoflavones: estrogenic  
280 activity, biological effect and bioavailability. *European journal of drug metabolism and*  
281 *pharmacokinetics*, 38(1), 15-25.
- 282 Wang, H. J., & Murphy, P. A. (1996). Mass balance study of isoflavones during soybean  
283 processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(8), 2377-2383.
- 284 Yerramsetty, V., Gallaher, D. D., & Ismail, B. (2014). Malonylglucoside Conjugates of  
285 Isoflavones Are Much Less Bioavailable Compared with Unconjugated  $\beta$ -Glucosidic  
286 Forms in Rats. *The Journal of nutrition*, 144(5), 631-637.
- 287 Yonemoto-Yano, H., Maebuchi, M., Fukui, K., Tsuzaki, S., Takamatsu, K., & Uehara, M.  
288 (2014). Malonyl Isoflavone Glucosides Are Chiefly Hydrolyzed and Absorbed in the  
289 Colon. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(10), 2264-2270.
- 290 Zaheer K, Akhtar M.H. (2017) An updated review of dietary isoflavones: Nutrition, processing,  
291 bioavailability and impacts on human health. *Critical Reviews in Food Science and*  
292 *Nutrition*, 57(6), 1280-1293.

Figure 1

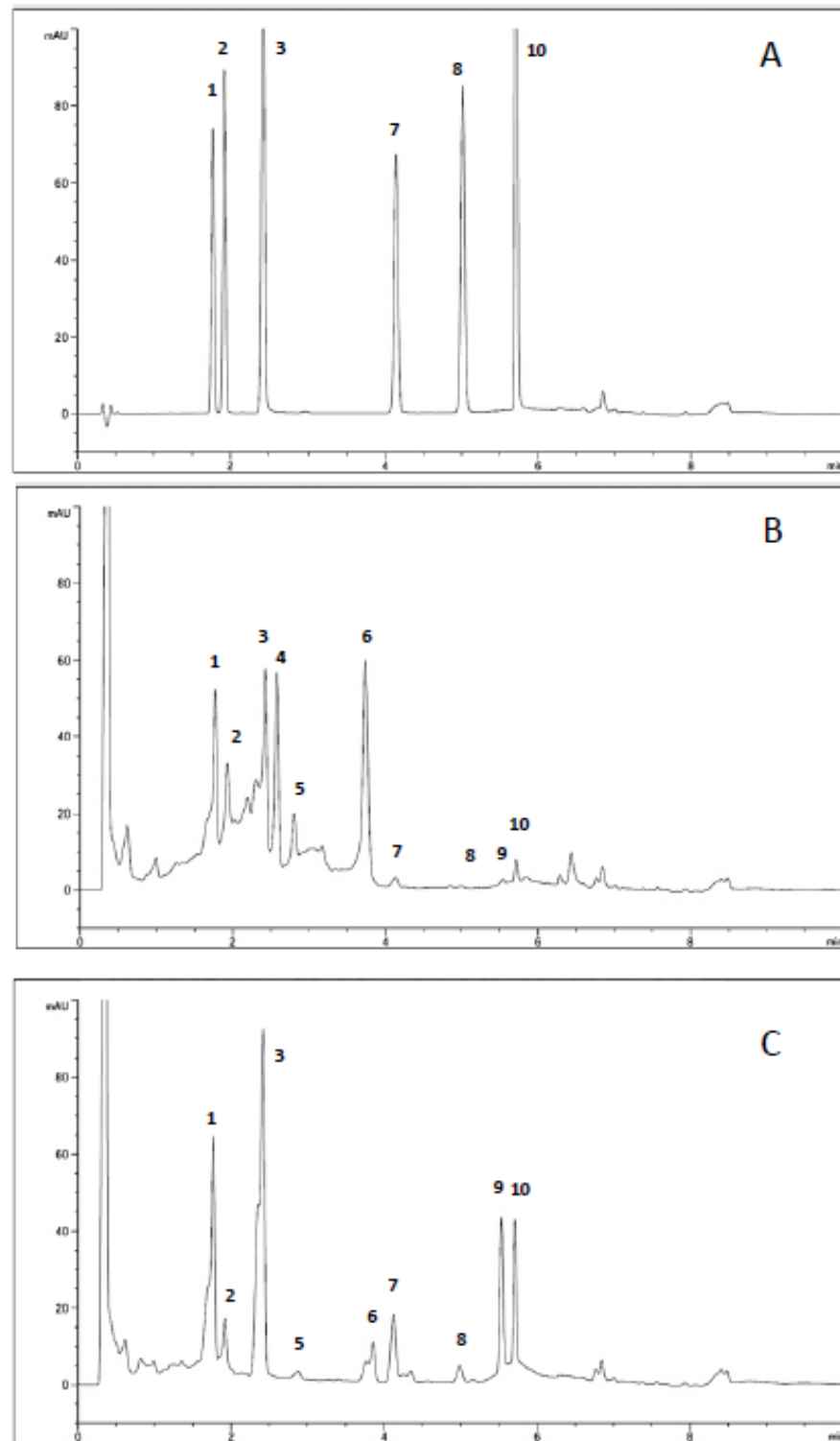
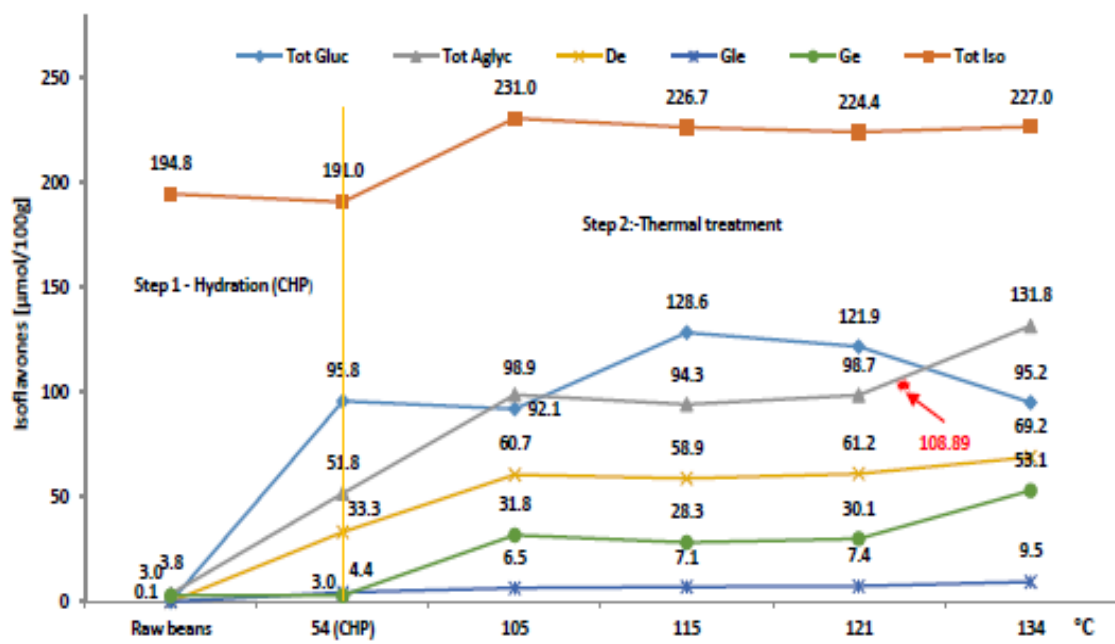


Figure 2





## CAPÍTULO 4 - DISCUSSÃO

As matérias-primas foram processadas de acordo com o planejamento experimental dos parâmetros operacionais (variáveis independentes) de maior influência no PHDC e das propriedades funcionais e de conveniência dos produtos (variáveis dependentes ou respostas). Após a determinação das condições de contorno das variáveis operacionais, foi realizada a otimização do PHDC em função do tempo e da temperatura na transformação das isoflavonas em agliconas e derivados. A hidratação (Item 9.1) e a incubação (Item 9.5) das amostras foram executadas nas condições otimizadas de atividade das endoenzimas  $\beta$ -glicosidasas, visando obter a maior conversão das isoflavonas em agliconas, tanto pelas enzimas endógenas como pelo efeito térmico (Item 9.9), durante o cozimento dos grãos de soja.

### 1. Tempo de Hidratação ( $t_H$ )

O processo de hidratação foi realizado em uma grande faixa de temperatura (30 – 80 °C) e velocidade (5-30 rpm), ajustando-se o tempo de hidratação (Tabela 3) para a absorção total do volume equivalente ( $V_{eff}$ ). A hidratação dos grãos aumentou a umidade da matéria-prima de 8.6% para valores entre 57.35% e 60.47%; isso representa um aumento médio de 5.78 vezes o conteúdo inicial da umidade. Considerando a média de  $58.3 \pm 1.4$  %, os resultados indicaram que a quantidade de água absorvida pelos grãos de soja foi similar para todos os tempos de hidratação. Esses resultados são muito importantes do ponto de vista da eficiência do processo, particularmente para uma produção em grande escala, devido ao rendimento, consumo de água e energia, e considerações gerais de custo.

### 2. Otimização do tempo de hidratação ( $t_H$ )

Os ensaios de hidratação foram realizados seguindo o delineamento experimental nas diferentes temperaturas (30-80 °C) e velocidades (5-15 rpm) até absorção total do  $V_{eff}$  predeterminado. A Figura 4 mostra que a temperatura ( $t_H$ ) teve a maior influência na velocidade de hidratação dos grãos, em uma ampla faixa de velocidade de rotação ( $V$ ). O tempo necessário para a absorção total do  $V_{eff}$ , ao longo de todas as condições, variou de 45 min (80 °C, 10 rpm) a 270 min (30 °C, 10 rpm). Em função desses resultados, a otimização da hidratação pelo PHDC corresponde às coordenadas de 80 °C e 10 rpm, para o nível de tempo mínimo de 45 min. Entretanto, em função do nosso principal objetivo, que é promover a máxima conversão das isoflavonas em agliconas, as coordenadas de otimização

corresponderam a 55 °C; 15 rpm, para um tempo de absorção total de 90 min. A aplicação do fator ( $f_{v_{eff}} = 0.85$ ) de correção do volume efetivo (Tabela 6, 7 e 8, Anexo III) reduziu o tempo de absorção total para 60 min. Essas condições experimentais foram aplicadas para todos os testes de hidratação, incubação e tratamento térmico nesta pesquisa.

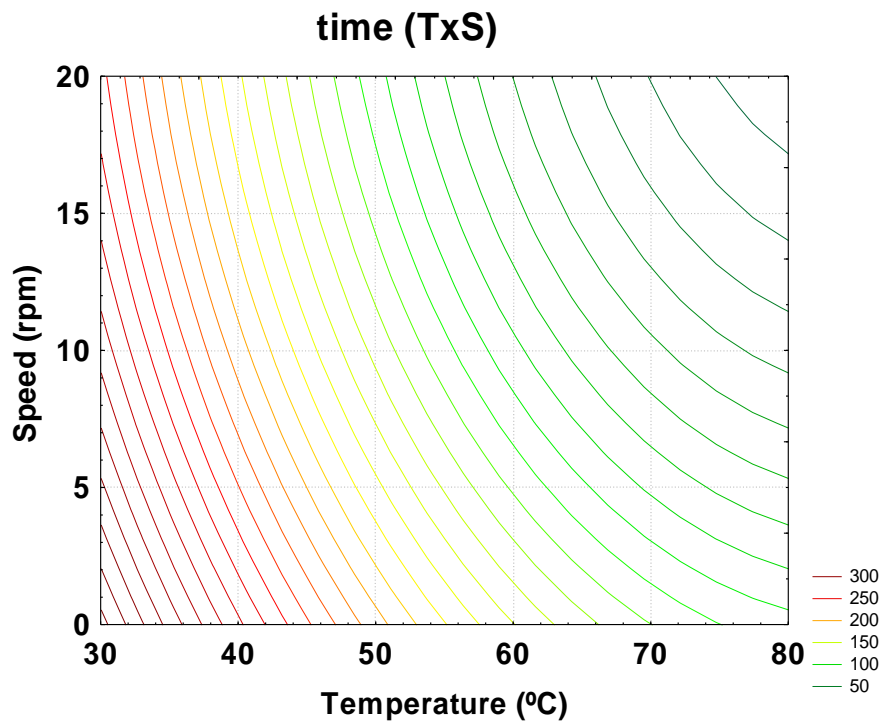
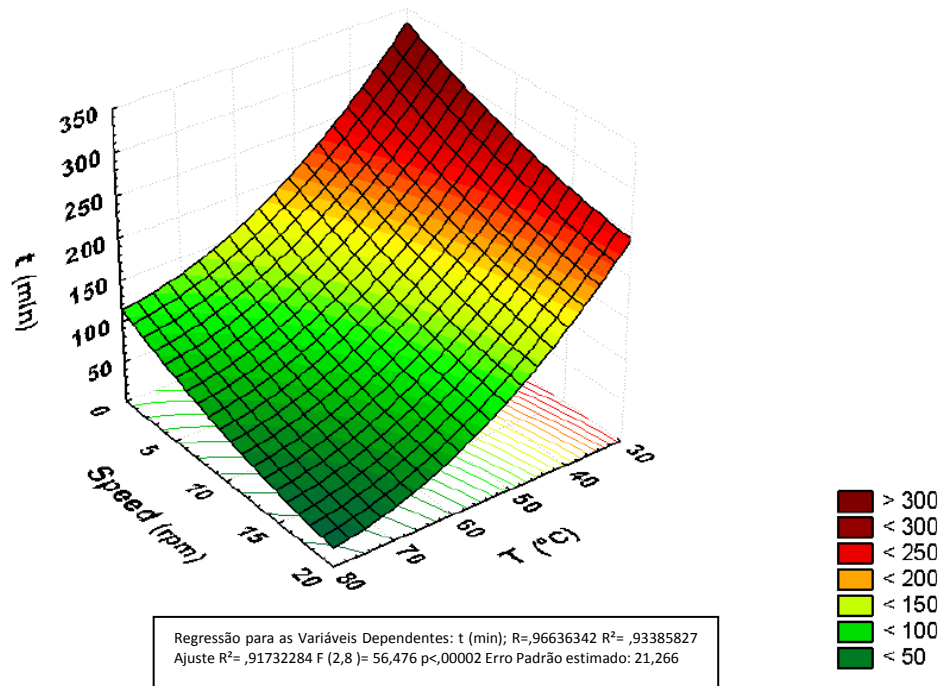
**Tabela 3. Condições experimentais utilizadas no processo de hidratação, os tempos e o teor de umidade final**

Experimentos	Temperatura (° C)	Velocidade (rpm)	Tempo (min)	Umidade (%)
1	37	7	240	59,72
2	73	7	85	58,15
3	37	13	225	59,23
4	73	13	70	56,14
5	30	10	270	60,13
6	80	10	45	57,39
7	55	5	150	57,35
8	55	15	90	60,47
9	55	10	150	57,55
10	55	10	120	57,35
11	55	10	125	57,50

É importante ressaltar que a velocidade de rotação da cuba de hidratação está associada à formação de um filme uniforme e constante na superfície dos grãos; velocidades baixas aumentam o tempo de absorção por apresentar áreas dos grãos não cobertas pelo solvente. Embora o tempo de hidratação possa ser reduzido com o aumento da temperatura, o que resultaria em custos menores e maior produtividade no processamento, a principal vantagem do controle da temperatura está relacionado às condições ótimas de atividade das enzimas endógenas, que resulta em maior eficiência na conversão das isoflavonas em agliconas e derivados.

### **3. Conversão de Isoflavonas em Agliconas e Derivados durante o Processo de Hidratação Diferencial Controlado - PHDC.**

O conteúdo de isoflavonas totais e derivados determinados nos diferentes tratamentos estão



**Figura 4. Otimização do tempo de hidratação ( $t_H$ ) em função da temperatura ( $T_H$ ) e da velocidade de hidratação ( $V_H$ )**

apresentados na Tabela 4 e nas (Figura 5 a 17). O efeito do processo de hidratação no conteúdo de isoflavonas totais (Figura 5) das formas glucosídicas (Figura 6) e agliconas individuais (Figura 7) pode ser observado nos gráficos de superfície de resposta gerados pelos modelos matemáticos de regressão.

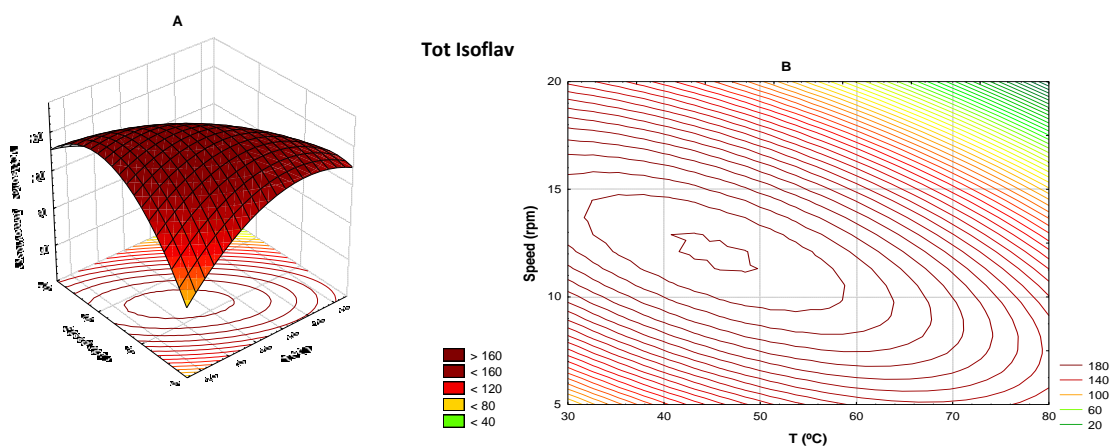
Inicialmente, a matéria-prima apresentou pequenas quantidades das agliconas (Tabela 4). Entretanto, os resultados indicaram que a hidratação teve um efeito significativo na mudança do perfil das agliconas, pois houve uma redução drástica na quantidade de isoflavonas glucosídicas (Figura 6) e malonil e acetil glucosídicas (Figura 14,15, 16 e 17) e um aumento na quantidade de isoflavonas agliconas que alcançaram valores de até 187.87  $\mu\text{g.g}^{-1}$  nas condições de 55 °C e 15 rpm (Figura 7). Nessas condições, a diadzeína (Figura 8), a genisteína (Figura 10) e a gliciteína (Figura 12) apresentaram os maiores valores (Tabela 4), mostrando a alta atividade enzimática, especialmente na produção da diadzeína precursor do (S)-Equol.

Em contraste, a quantidade de isoflavonas glucosídicas (Figura 6) foi reduzida de 917.13  $\mu\text{g.g}^{-1}$  para 741.49  $\mu\text{g.g}^{-1}$  (80 °C e 10 rpm) e para 413,62  $\mu\text{g.g}^{-1}$  (55 °C e 15 rpm), nas condições ótimas de atividade das endoenzimas, representando uma redução entre 19.15% e 54.90%. A temperatura teve a maior influência na concentração de glicosídeos totais (Figura 6) e, como esperado, as condições que produziram as menores quantidades de glicosídeos resultaram no aumento das agliconas, mostrando a interconversão entre as formas glucosídicas para as formas agliconas (Jackson et al., 2002; Uzzan et al., 2007; Pananun et al., 2012).

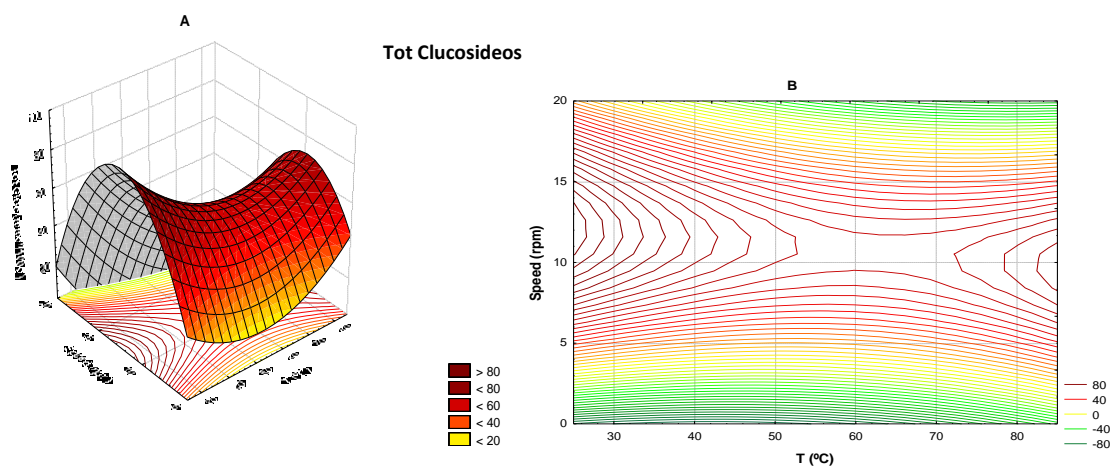
A transformação das isoflavonas em agliconas durante o processo de hidratação da soja pelas enzimas endógenas, a princípio, está relacionada à temperatura ótima de atividade destas enzimas, à disponibilidade dos substratos (no PHDC, a concentração dos substratos solúveis é de 100 % dos contidos nas matérias-primas) e à mobilidade das enzimas nas condições ideais de atuação. A avaliação dessa resposta é muito importante porque mostra a eficiência das enzimas endógenas na transformação das isoflavonas em agliconas e o efeito das variáveis operacionais temperatura e velocidade. Esses resultados são coerentes, considerando que a temperatura ótima da atividade da  $\beta$ -glucosidase endógena da soja é de 50 °C. Como observado, a área de máximo de isoflavonas totais na Figura 5 está localizada na faixa de temperatura entre 40 a 50 °C e velocidades entre 10 a 15 rpm.

**Tabela 4. Efeito da temperatura e da velocidade de rotação no perfil de Isoflavonas, Agliconas e Derivados ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )**

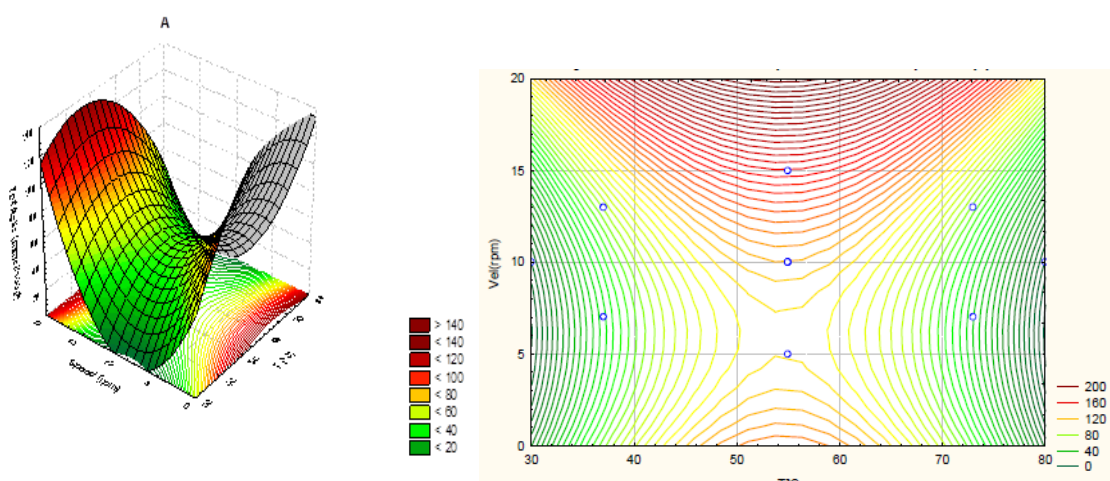
Proc	Cód	Condições	Di	Gly	Gi	Mdi	MGly	Mgi	De	Gle	Agi	Ge	Tot Iso	Tot Glic	Tot Aglic
		M-prima	102.9	41.5	204.6	144.7	40.2	383.0	0.3	1.9	0.3	8.0	927.3	917.1	10.2
<b>I</b>	-1; -1	37°C/7rpm	49.9	20.7	183.1	91.6	17.0	281.7	28.7	1.4	0.3	7.7	682.3	644.2	38.2
<b>II</b>	+1; -1	73°C/7rpm	81.8	21.1	178.2	86.8	17.5	257.2	21.9	1.5	0.2	15.1	681.3	642.8	38.5
<b>III</b>	-1; +1	37°C/13rpm	57.3	19.8	176.2	104.3	29.4	259.5	35.9	1.7	0.2	7.7	692.1	648.8	45.3
<b>IV</b>	+1; +1	73°C/13rpm	89.1	31.1	204.4	97.2	20.4	289.3	26.0	1.7	0.3	18.1	778.5	732.7	45.8
<b>V</b>	-1.41; 0	30°C/10rpm	61.7	35.7	117.2	91.5	19.8	245.7	35.6	1.6	0.2	11.7	620.8	571.8	48.9
<b>VI</b>	+1.41; 0	80°C/10rpm	75.2	14.7	252.7	92.9	19.2	286.5	19.3	1.8	0.3	8.5	771.1	741.5	29,6
<b>VII</b>	0; -1.41	55°C/5rpm	51.0	14.8	93.7	85.3	20.1	239.9	78.9	1.8	0.3	38.9	624.7	505.1	119,6
<b>VIII</b>	0; +1.41	55°C/15rpm	38.8	21.1	83.0	68.3	17.5	185.6	119.3	16.8	0.2	51.8	601.5	413.6	187,9
<b>IX</b>	0;0	55°C/10rpm	54.2	24.7	183.0	99.8	25.8	267.2	78.4	11.9	0.2	33.4	778.5	654.8	123.7
<b>X</b>	0;0	55°C/10rpm	54.8	23.0	176.2	99.5	25.8	270,8	79.1	12.0	0.0	33.4	774.8	650.3	124.5
<b>XI</b>	0;0	55°C/10rpm	54.47	23.8	179.6	99.7	25.8	269.0	78.7	11.9	0.2	33.4	776.6	652.6	124.2



**Figura 5. Gráficos de Superfícies de Respostas do efeito da Velocidade de Rotação (V) e da Temperatura de Hidratação (Th) do processo no conteúdo de Isoflavonas Totais (Total)**



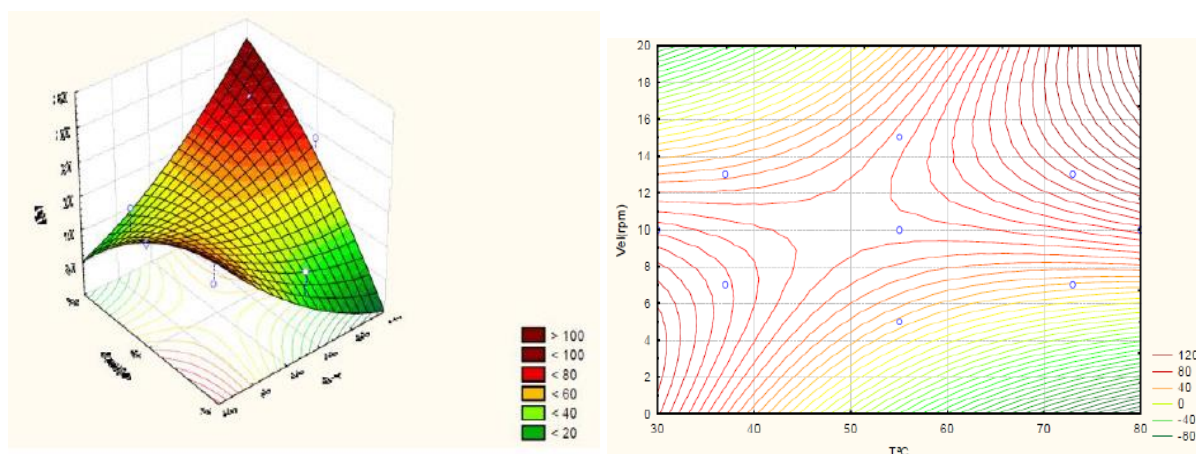
**Figura 6. Gráficos de Superfícies de Respostas do efeito da Velocidade de Rotação (V) e da Temperatura de Hidratação (Th) do processo no conteúdo de Total Glucosídeos (TTGluc)**



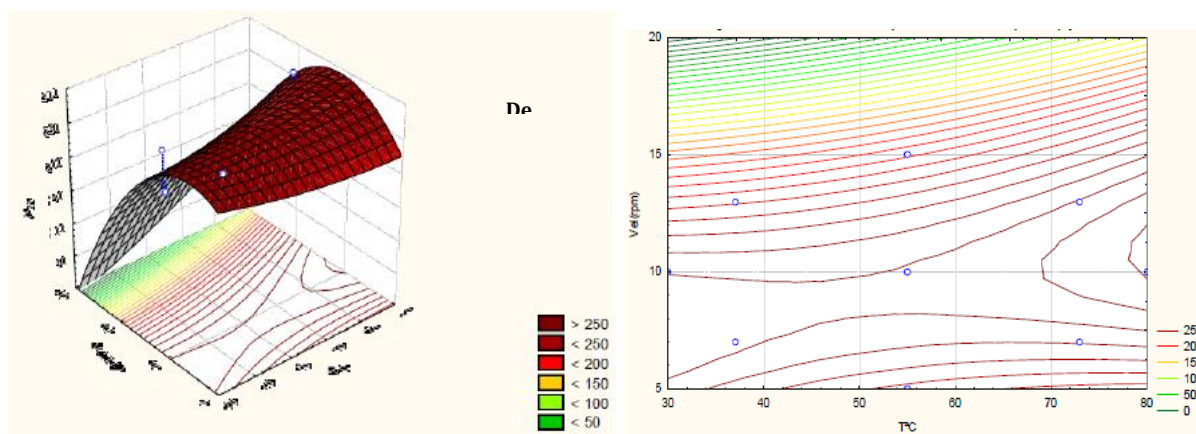
**Figura 7. Gráficos de Superfícies de Respostas do efeito da Velocidade de Rotação (Vh) e da Temperatura de Hidratação (Th) do processo no conteúdo de Total Agliconas (TTAglic)**

Em relação ao conteúdo das isoflavonas totais, houve uma redução na faixa de 19.15% e 54.90%, que correspondem, exatamente, às taxas das isoflavonas agliconas 80° C/10 rpm (inativação enzimática) e 55° C/15 rpm (temperatura ótima de atividade da endoenzima), respectivamente. Por outra lado, a redução na quantidade de isoflavonas totais, entre as formas químicas das isoflavonas, está relacionada com a menor massa molecular das formas agliconas em relação às suas respectivas formas glucosídicas. Por exemplo, a genistina (Figura 10) tem uma massa molecular de 432.37 g.mol<sup>-1</sup> enquanto na genisteína (Figura 17), a massa molecular é de 270.24 g.mol<sup>-1</sup>, o que representa uma redução de aproximadamente

37.5% na massa molecular. Nesse contexto, a menor massa das moléculas de todas as formas agliconas em relação às formas glucosídicas explica a redução da quantidade total de isoflavonas. É importante ressaltar que não há perda de solvente no processo, independentemente do tempo de hidratação, uma vez que a totalidade de água de hidratação é absorvida pelos grãos, e o conteúdo de isoflavonas é mantido constante. Embora o tempo de hidratação possa ser reduzido com o aumento da temperatura, é necessário considerar que a conversão das isoflavonas glucosídicas (Figura 8, 10 e 12) em agliconas, pela ação enzimática, ocorre em temperaturas baixas. Os derivados resultantes como as isoflavonas residuais, acetil e malonil glucosídicas, podem ser transformados nas formas glucosídicas (Figuras 14, 15, 16 e 17) e, posteriormente, em agliconas, com o aumento do tratamento térmico, resultando em maior conversão.

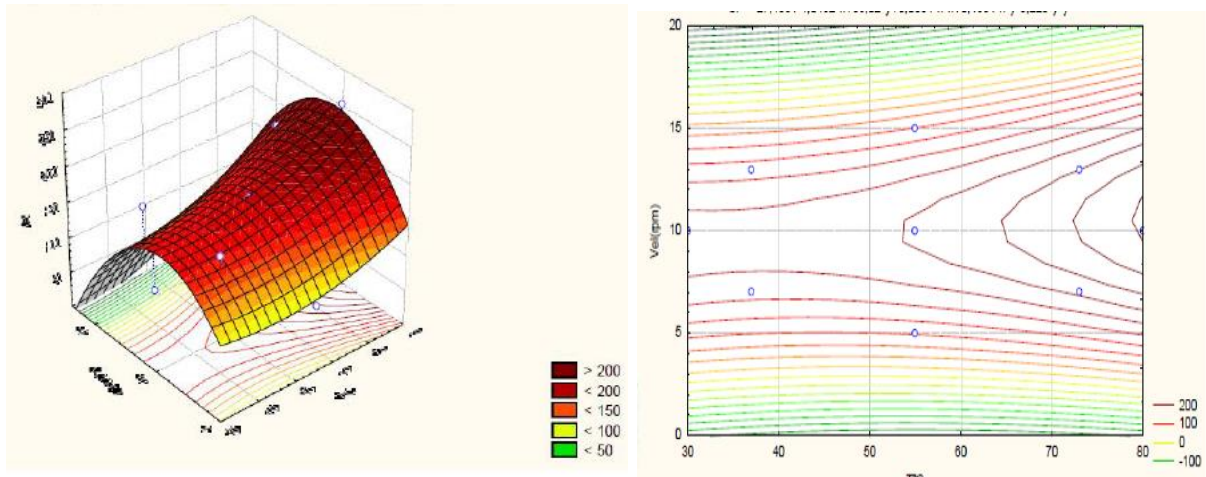


**Figura 8. Gráficos de Superfícies de Respostas do efeito da Velocidade de Rotação (V) e da Temperatura de Hidratação (T<sub>h</sub>) do Processo no conteúdo de Diadzeina (Di)**

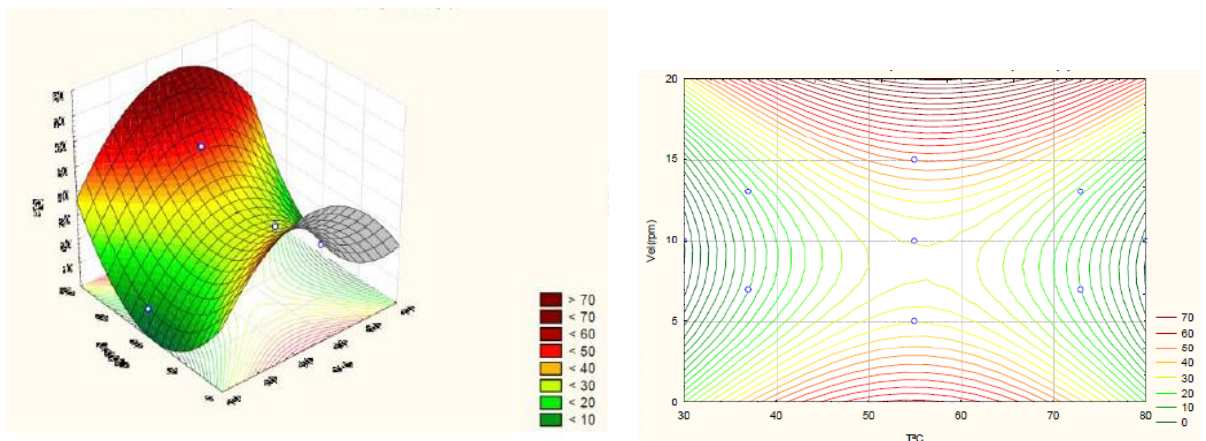


**Figura 9. Gráficos de Superfícies de Respostas do efeito da Velocidade de Rotação (V) e da Temperatura de Hidratação (T<sub>h</sub>) do processo no conteúdo de Daizina (De)**

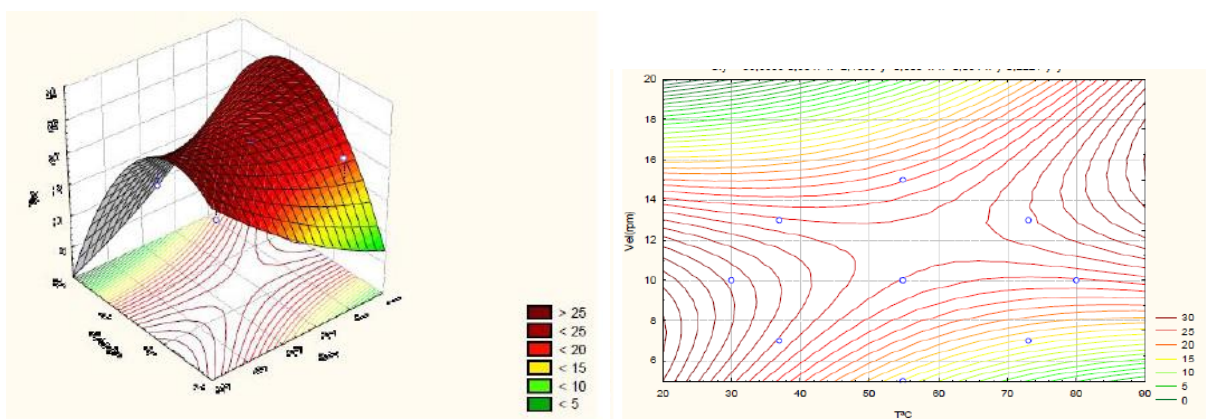




**Figura 10. Gráficos de Superfícies de Respostas do efeito da Velocidade de Rotação (V) e da Temperatura de Hidratação (Th) do processo no conteúdo de Genisteína (Gi)**

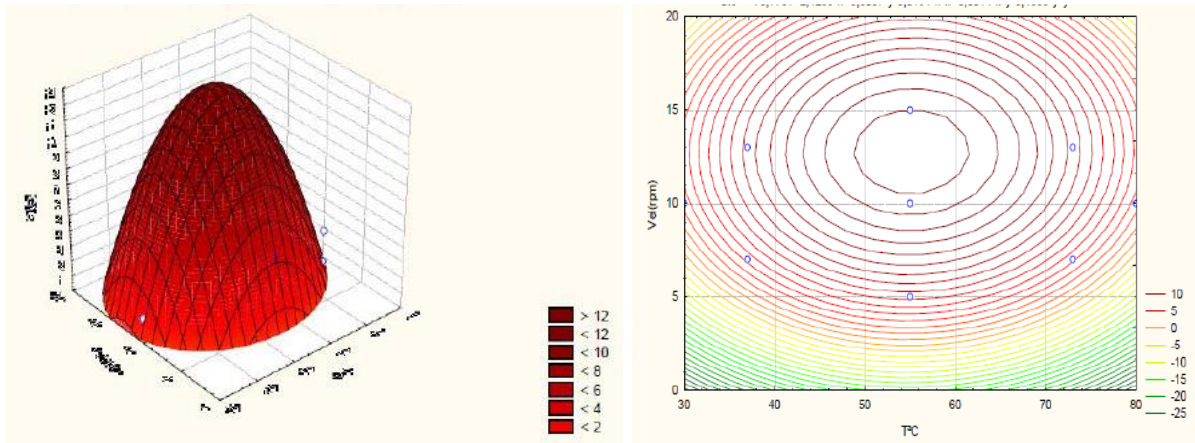


**Figura 11. Gráficos de Superfícies de Respostas do efeito da Velocidade de Rotação (V) e da Temperatura de Hidratação (Th) do processo no conteúdo de Genistein (Ge)**

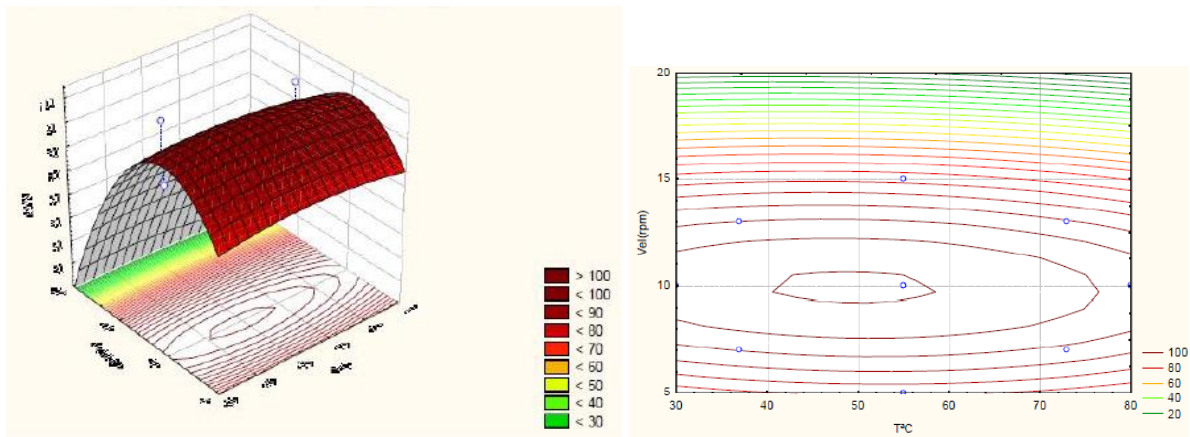


**Figura 12. Gráficos de Superfícies de Respostas do efeito da Velocidade de Rotação (V) e da Temperatura de Hidratação (Th) do processo no conteúdo de Gliciteína (Gly)**

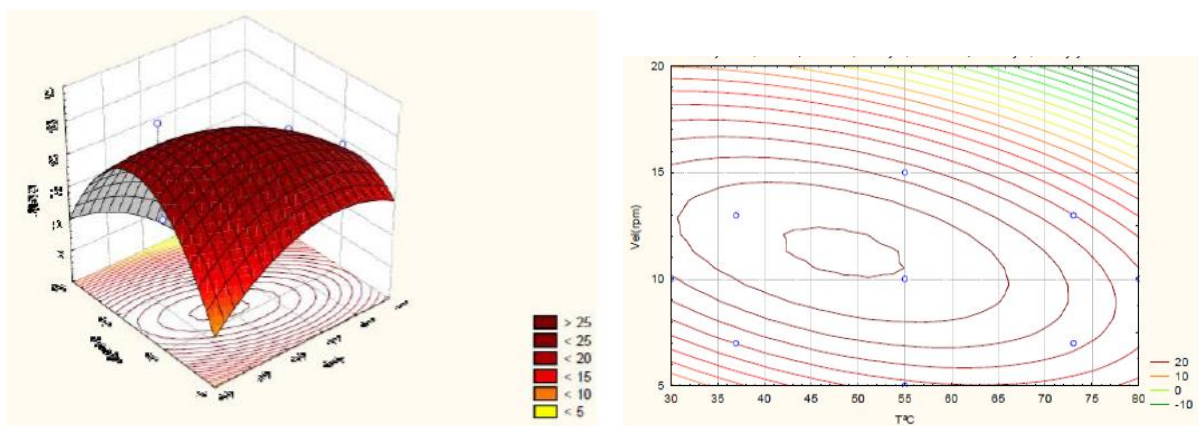




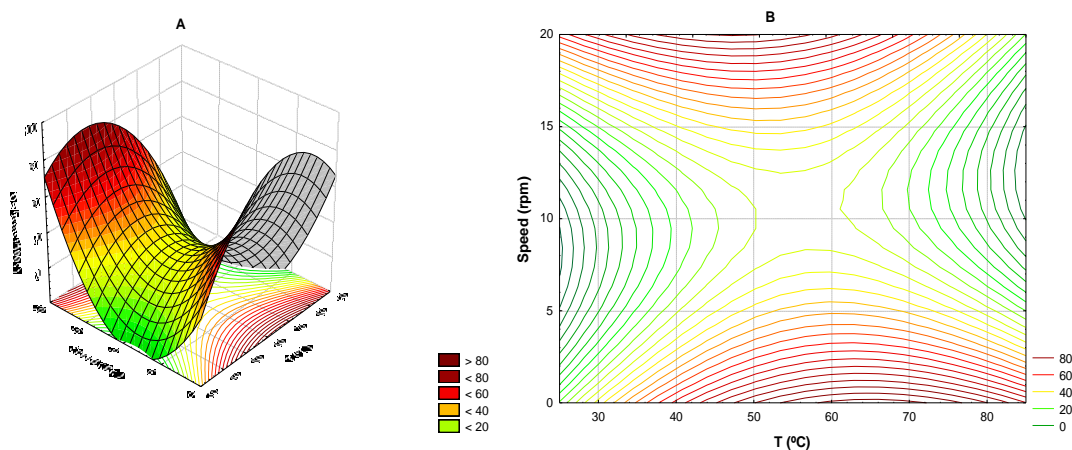
**Figura 13.** Gráficos de Superfícies de Respostas do efeito da Velocidade de Rotação (V) e da Temperatura de Hidratação ( $T_H$ ) do processo no conteúdo de Gliciteín (Gle)



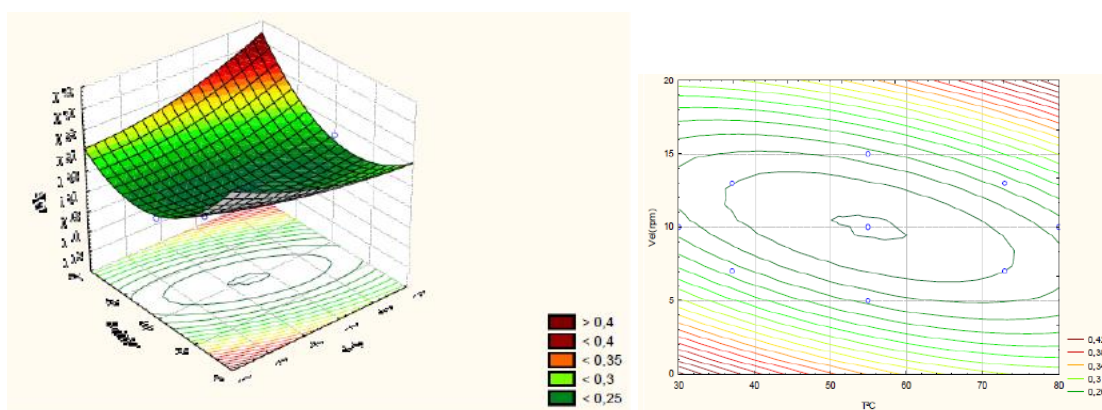
**Figura 14.** Gráficos de Superfícies de Respostas do efeito da Velocidade de Rotação (V) e da Temperatura de Hidratação ( $T_H$ ) do processo no conteúdo de Malonil-Diadzeina (MDi)



**Figura 15.** Gráficos de Superfícies de Respostas do efeito da Velocidade de Rotação (V) e da Temperatura de Hidratação ( $T_H$ ) do processo no conteúdo de Malonil- Gliciteína (MGly)



**Figura 16. Gráficos de Superfícies de Respostas do efeito da Velocidade de Rotação (V) e da Temperatura de Hidratação ( $T_H$ ) do processo no conteúdo de Malonil- Genisteína (MGi)**



**Figura 17. Gráficos de Superfícies de Respostas do efeito da Velocidade de Rotação (V) e da Temperatura de Hidratação ( $T_H$ ) do processo no conteúdo de Acetil Genisteína (Agi)**

A otimização do processo visando o maior rendimento em agliconas, ou seja, uma ação eficiente das enzimas endógenas em tempo de hidratação compatível com o processamento, pode ser observada na interseção da velocidade com a temperatura na área máxima de agliconas (Figura 7). Os parâmetros que satisfazem essa condição correspondem a um valor de temperatura de  $54^{\circ}\text{C}$  e velocidades maiores a 10 rpm, resultando em valores de agliconas entre 175 a  $200 \mu\text{g.g}^{-1}$  e tempos de hidratação próximos a 60 minutos. O gráfico de

superfície indica que valores superiores ou inferiores a esta temperatura e velocidades de rotação menores a 10 rpm produzem menores quantidades desses compostos. Esses parâmetros operacionais representam condições adequadas, em termos de conversão de isoflavonas em agliconas, e tempos de hidratação compatíveis com um processamento industrial eficiente, permitindo ainda que, durante a incubação e o tratamento térmico, continuem as conversões das isoflavonas e derivados. Uma vez que as condições de hidratação otimizadas foram determinadas, foi avaliado o efeito do tempo da incubação dos grãos de soja na conversão das formas químicas das isoflavonas glicosídicas e malonil pelas  $\beta$ -glucosidases endógenas, e pela hidrólise térmica durante o pré-cozimento.

#### **4. Retenção de Isoflavonas**

A grande vantagem da hidratação pelo PHDC é permitir a retenção de agliconas bioconvertidas, enquanto as enzimas endógenas ainda estão em atividade, resultado que se torna evidente pela inspeção da constância quase molar das isoflavonas totais (Tabela 4). Ao contrário da imersão estática, no PHDC, os grãos foram uniformemente expostos a quantidades limitadas ( $V_{\text{eff}}$ ) de água enquanto a água se difunde para o interior dos grãos, impulsionada por um gradiente de concentração de umidade. Uma vez que o equilíbrio de entumescimento está próximo a ser atingido, as sementes não ficam mais expostas à água, o que evita a difusão reversa e a perda de material solúvel, enquanto a ação enzimática continua.

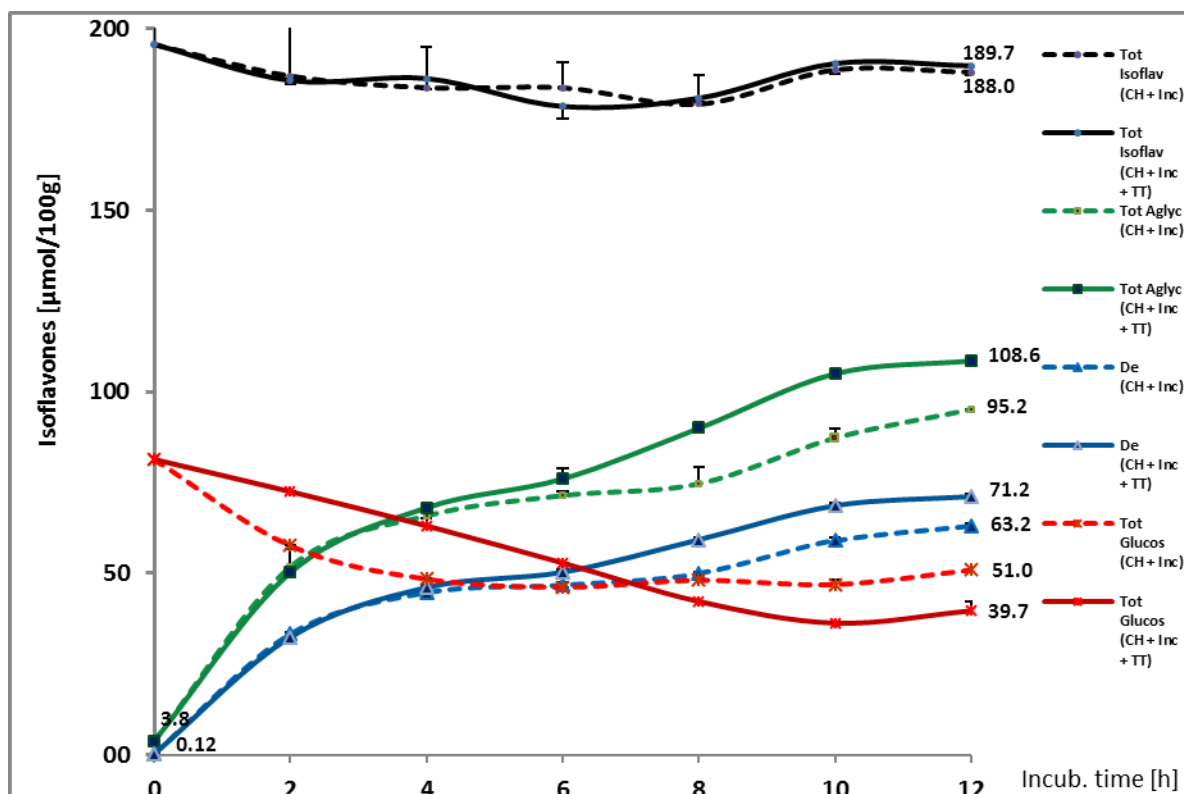
#### **5. Incubação**

As amostras de soja hidratadas pelo PHDC nas condições ótimas de atividade das  $\beta$ -glucosidases (54 °C, 15 rpm/60 min) foram submetidas à incubação nessas mesmas condições e monitoradas ao longo de 12 horas. Os resultados estão apresentados na Tabela 5 e na Figura 18. Aumentando-se o tempo de incubação, foi possível aumentar a quantidade de isoflavonas agliconas resultantes da hidrólise enzimática, alcançando um máximo de 247.97  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , depois de 12 horas (tempo máximo compatível com a manutenção das propriedades sensoriais). Houve uma redução da quantidade de isoflavonas glicosídicas e um aumento da quantidade das agliconas, o que mostrou a importância da incubação para maximizar a taxa de conversão das isoflavonas para agliconas. Observou-se, também, uma redução na quantidade de isoflavonas totais, possivelmente relacionada com a interconversão entre as formas químicas com menor massa molecular das agliconas em relação às formas glicosídicas.

**Tabela 5. Efeito da Incubação e do Tratamento Térmico no Perfil de Isoflavonas, Agliconas e Derivados ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )**

	Di	Gly	Gi	Mdi	MGly	Mgi	De	Gle	Agi	Ge	Total	Total Glucosídeos	Total Aglicona	% glucosídeos mantidos
54/15/15/2/A	67,34	41,00	139,27	94,14	26,10	262,45	84,55	12,54	15,11	38,11	780,62	645,42	135,20	57,76
54/15/4/B	56,37	38,60	113,48	79,95	26,55	246,36	113,60	14,34	4,53	43,50	737,29	565,85	171,44	50,64
54/15/6/C	49,09	36,21	113,55	73,65	23,53	224,92	118,92	15,43	16,87	51,91	724,07	537,82	186,25	48,13
54/15/8/D	50,14	34,36	122,67	66,04	20,02	192,34	126,81	18,11	11,31	49,70	691,50	496,89	194,62	44,47
54/15/10/E	49,55	35,48	109,99	50,00	20,36	181,41	149,92	19,00	26,19	58,35	700,23	472,97	227,26	42,33
54/15/12/F	55,61	37,54	125,98	44,33	12,28	168,18	160,43	20,71	6,50	66,82	698,38	450,41	247,97	40,31
54/15/2/TT5/I	81,38	42,93	187,34	67,95	23,04	220,28	82,26	10,12	12,18	38,56	766,04	635,10	130,94	56,84
54/15/4/TT5/II	69,70	40,23	149,16	53,47	24,98	196,97	117,15	17,40	7,90	42,89	719,84	542,40	177,44 (8%)	48,54
54/15/6/TT5/III	54,69	29,11	143,56	47,74	20,97	187,46	127,88	17,23	0,26	53,11	682,01	483,79	198,22 (6%)	43,30
54/15/8/TT5/IV	48,98	24,98	107,65	45,59	20,53	184,32	150,64	21,31	0,27	62,74	667,01	432,32	234,69 (25%)	38,69
54/15/10/TT5/V	40,91	21,59	93,55	48,02	18,72	170,95	174,46	29,78	13,51	69,95	681,43	407,25	274,18 (9%)	36,45
54/15/12/TT5/VI	40,48	18,08	112,09	49,61	11,26	151,84	180,91	28,28	0,26	74,15	666,95	383,61	283,34 (14%)	34,33

A evolução das isoflavonas totais e das espécies individuais mais comuns de isoflavonas em amostras de soja, ao longo da hidratação e incubação, mostrou a diminuição progressiva das formas conjugadas e glicosiladas, contrastando com aumentos proporcionais das formas agliconas e da daidzeína em particular. As transformações das isoflavonas em agliconas durante o processo de hidratação controlada somente poderiam ocorrer pela ação das  $\beta$ -glicosidases endógenas. O efeito adicional do tratamento térmico pode ser observado nas variações das isoflavonas (Figura 18). As concentrações de isoflavonas no material de partida foram (em  $\mu\text{mol}\cdot 10^{-2}\text{g}^{-1}$ ): malonilistina (78), genistina (47), malonildaidiz (29), glicitina (9), malonilglicitina (8), daidzina (4), genisteína (2,9), daidzeína (0,12), gliciteína (0,67) e acetilgenistina (0,06). Glucosídeos foram os principais e, as agliconas, as espécies químicas menos abundantes (3,8). Os desvios-padrão relativos para todas as isoflavonas foram inferiores a 4,34%. Como apontado por Rostagno et al., (2009), a temperatura provavelmente seria o determinante mais influente da concentração de glucosídeos totais.



**Figura 18.** Evolução do perfil de isoflavonas ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-2}$ ) dos grãos de soja durante o processo de hidratação controlada (PHDC) por 1 hora, incubação (Inc) por até 12 horas e tratamento térmico de 5 minutos (TT)

## 6. Otimização do tempo de incubação (TI)

Uma vez que as condições ótimas de hidratação foram determinadas, foi avaliado o efeito do tempo de incubação por um período de 12 horas na hidrólise dos glicosídeos e no perfil das isoflavonas após a hidratação, prévio ao tratamento térmico (Figura 18). Qualquer aumento na quantidade de agliconas foi, obviamente, o resultado do tempo de exposição dos substratos glicosídicos às  $\beta$ -glucosidases endógenas de soja. Nesse ponto, a quantidade total de espécies de agliconas atingiu o valor de  $247,96 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , enquanto os glicosídeos atingiram o menor valor ( $450,42 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ), significando que aproximadamente 51% dos glicosídeos originais de isoflavonas foram convertidos nas respectivas formas de agliconas.

Quanto aos derivados de genisteína, observou-se redução na quantidade de malonil-genistina (de  $383,01$  para  $168,18 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) após 12 horas de incubação, embora sem aumento correspondente na quantidade de genistina. Este evento sugeriu que o conjugado poderia ter sido convertido diretamente em aglicona. Consequentemente, e de acordo com a observação

acima, a quantidade de genisteína aumentou de 8,03 para 66,82  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ . No caso da daidzeína e seus derivados, uma redução significativa na quantidade de malonil-daidzeína também foi observada quando a TI foi aumentada de 2 para 12 horas. Mais uma vez, os dados sugerem que o tempo extra de hidrólise durante a incubação permitiu a conversão simultânea do conjugado malonilado em glicosídeo, e a seguir para agliconas. A diadzeína teve um aumento substancial em função do tempo de incubação, em comparação com as outras agliconas após 12 horas de incubação, a quantidade de daidzeína aumentou de 0,12 para 63,10  $\mu\text{mol} \cdot 10^{-2} \text{g}^{-1}$ .

### **7. Pré-cozimento a 121 °C**

Embora o principal objetivo do pré-cozimento seja o desenvolvimento das propriedades sensoriais (textura, sabor, cor e aroma) e a inativação das substâncias antinutricionais da soja, o tratamento térmico também contribuiu para o aumento da biodisponibilidade de seus produtos resultantes. O efeito adicional da conversão das isoflavonas em agliconas, após a hidratação e incubação pelo pré-cozimento, mostrou o grande potencial do tratamento térmico na conversão das isoflavonas residuais (ou derivados) e conseqüentemente na redução do tempo total do processo.

### **8. Conversão das Isoflavonas Malonil Glucosídicas**

O pré-cozimento sob pressão a 121 ° C, por 5 minutos, das amostras hidratadas pelo PHDC e incubadas, promoveu também a conversão das isoflavonas residuais do tipo malonil glucosídicas, que não foram transformadas pela ação das enzimas endógenas durante a hidratação e incubação, para as formas agliconas e glicosídicas. A quantidade de isoflavonas individuais e totais produzidas é apresentada na Tabela 5 e na Figura 18. O aumento das agliconas devido ao tratamento térmico para as amostras com 8 e 12 horas de incubação foi de 25 e 15%, respectivamente; houve conversão das formas malonil glucosídicas para suas respectivas formas glucosídicas (M. Rostagno, Palma, & Barroso, 2004). A formação de isoflavonas glicosídicas pela hidrólise térmica das formas malonil é muito importante para o aumento da biodisponibilidade, pois a absorção dos derivados glicosídicos pelos seres humanos é maior do que a dos derivados malonil. Essa etapa resultou em aumentos adicionais das três agliconas, como visto na Figura 18. Vale a pena destacar os aumentos notáveis de daidzeína, porque essa aglicona é particularmente relatada como precursora do (S) -equol (Setchell et al., 2005), um metabólito da microbiota com ação fisiológica em humanos. Sua

concentração molar (daidzeína), no final do pré-cozimento, aumentou 593 vezes, de 0.12  $\mu\text{mol}\cdot 10^{-2}\text{g}^{-1}$  (na matéria-prima), para 71,16  $\mu\text{mol}\cdot 10^{-2}\text{g}^{-1}$ .

Em geral, o maior efeito do pré-cozimento foi aumentar ainda mais as concentrações finais de agliconas totais do produto intermediário incubado, em média de 14%, divididos em 36,6% para gliciteína, 12,7% para daidzeína e 10,9% para genisteína. Como era de se esperar, tais aumentos foram acompanhados por decréscimos proporcionais dos correspondentes conjugados de malonil e glicosídeos. O modesto efeito do pré-cozimento na conversão de glicosídeos nas formas agliconas pode ser devido à temperatura relativamente baixa usada (121 °C). Existem evidências mostrando que temperaturas superiores a 150 °C seriam necessárias para uma hidrólise mais extensa dos glicosídeos (Rostagno et al., 2004).

Finalmente, destaca-se que o aumento na quantidade de daidzeína que não poderia ser explicado pela conversão hidrolítica direta de daidzina e malonil-daidzina para a aglicona (63.10  $\mu\text{mole}\cdot 10^{-2}\text{g}^{-1}$ ), no final da TI, ou 71.16  $\mu\text{mole}\cdot 10^{-2}\text{g}^{-1}$ , no final do pré-cozimento, poderia ser explicado pela ação de hidroxilases endógenas específicas. Reações que levaram a interconversões simultâneas de genistina em daidzina e, seguidas por hidrólise, à daidzeína, foram relatadas ocorrendo em soja (Artigot, Baes, Daydé, & Berger, 2013; Barnes, 2010; Dixon e Steele, 1999; Hakamatsuka, Mori, Ishida, Ebizuka e Sankawa, 1998;). Em apoio a esta interpretação, existe o fato de que a soma molar original de todas as formas contendo a molécula de genisteína (121.26  $\mu\text{mole}\cdot 10^{-2}\text{g}^{-1}$ ) poderia, na maioria das vezes, explicar a soma final total de todas as formas da genisteína (90.75  $\mu\text{mole}\cdot 10^{-2}\text{g}^{-1}$ ), mais as formas contendo daidzeína inexplicadas (37.37  $\mu\text{mole}\cdot 10^{-2}\text{g}^{-1}$ ). A diferença entre essas duas fontes (6.86  $\mu\text{mole}\cdot 10^{-2}\text{g}^{-1}$ ) pode ser explicada por outra fonte ou por eventuais perdas mínimas.

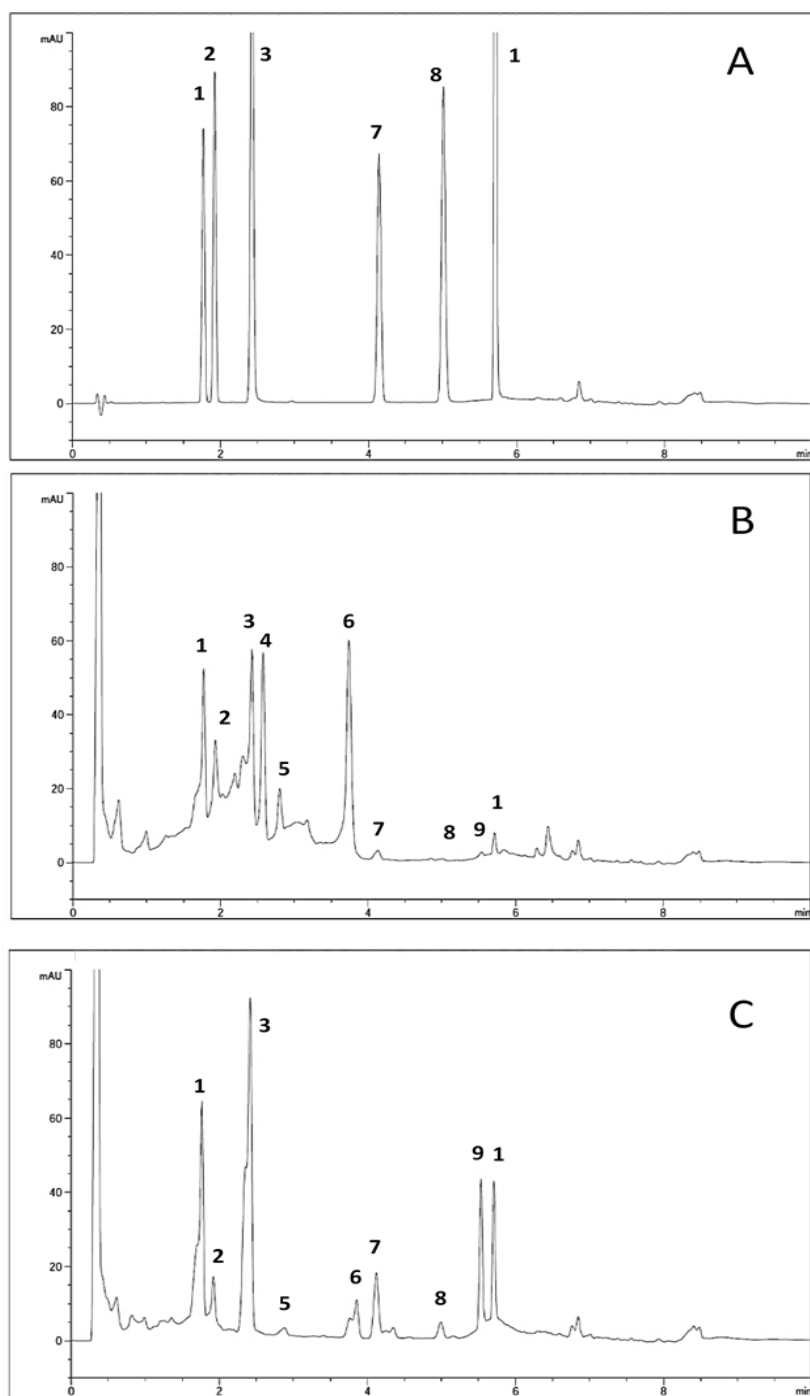
## **9. Conversão de Isoflavonas durante o processo de Hidratação Diferencial Controlada e do Tratamento Térmico em Quatro Temperaturas**

O tratamento térmico a 121 °C aplicado às amostras hidratadas e incubadas entre 2 a 12 horas mostrou que a transformação das isoflavonas glucosídicas para agliconas foi significativa, atingindo um máximo de 25% em 8 horas de incubação. Em função desses resultados, foi estudado o efeito do tratamento térmico na conversão das isoflavonas das amostras hidratadas pelo PHDC, sem incubação, em quatro níveis de temperatura (105;115;121,134 °C), por 5 minutos. Os resultados estão expostos nas Figuras 19 e 20.

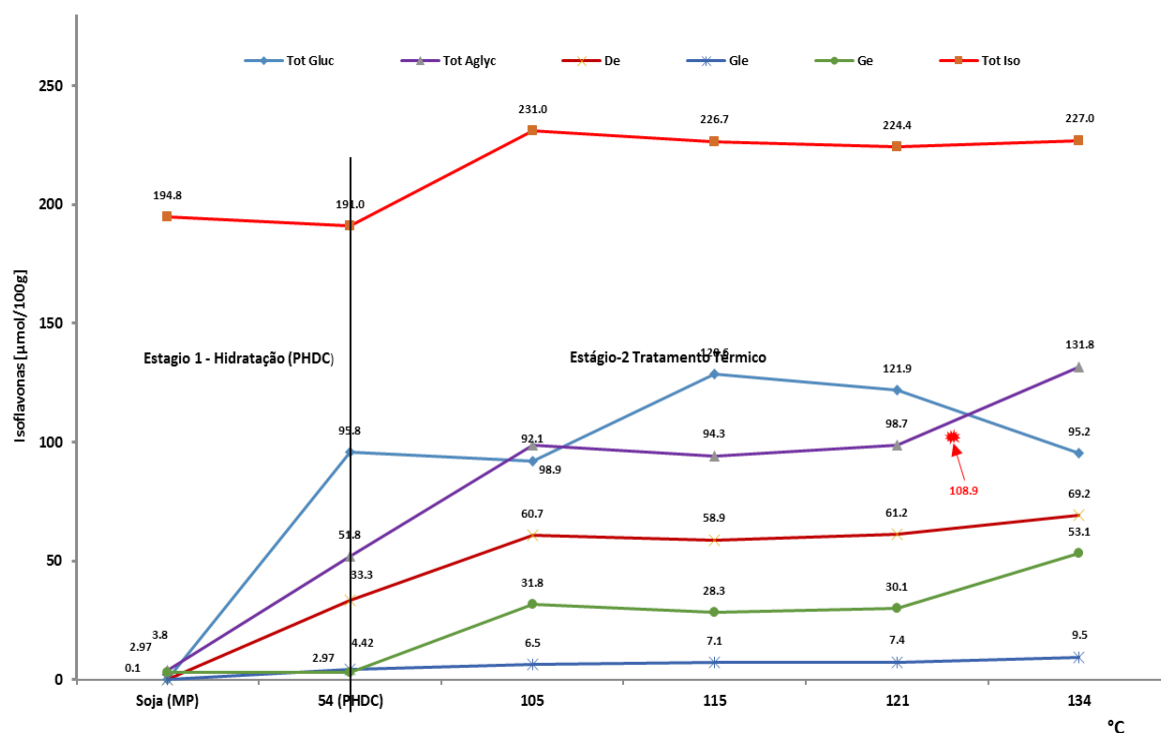
A determinação cromatográfica das principais formas de isoflavonas extraídas gerou o perfil representado na Figura 19. Como esperado, a matéria-prima (Figura 19B) apresenta altos teores de glicosídeos (picos 1, 2 e 3) e baixos teores de agliconas (picos 7, 8 e 10). Por outro lado, os lotes que foram tratados a 134 °C (Figura 19C) exibiram reduções de conjugados de malonil (picos 4, 5 e 6) e aumentos de glicosídeos em associação com aumentos substanciais de agliconas. Foi interessante observar que houve um aumento da acetilgenistina (9), que também foi relatado quando tratada com calor seco (Chien, Hsieh, Kao & Chien, 2005).

A Figura 20 mostra o aumento dos glucosídeos e das agliconas totais ocorrendo de forma simultânea durante a hidratação de 60 minutos, à temperatura da atividade ótima da  $\beta$ -glucosidase endógena (54 °C). Além deste ponto, podemos observar os efeitos dos tratamentos térmicos individuais a 105, 115, 121 e 134 °C. O comportamento foi praticamente linear para as temperaturas entre 115 a 121 °C, para todas as isoflavonas e derivados, exceto para os glucosídeos, antes da queda final para 134 °C. O aumento da temperatura de 54 °C para 105 °C resultou no aumento de 90% das agliconas, mostrando que a autoclavagem das amostras a esta temperatura é uma alternativa interessante para seu uso como ingrediente de saladas minimamente processadas, ricas em agliconas e com textura adequada, especialmente porque aumentos posteriores da temperatura, entre 105 a 121 °C, não afetaram significativamente o teor de agliconas, a curva das agliconas ficou praticamente constante. Entretanto, o aumento das agliconas, entre 121 a 134 °C, foi de 33%. A autoclavagem a 105 °C elevou o teor total de agliconas de 51,8 a 98,9  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g}$ , ou quase 75% do total atingível a 134 °C, enquanto a daidzeína aumentou de 33,3 para 60,7  $\mu\text{mol}/100 \text{ g}$  (87% do máximo atingível a 134 °C) e genisteína de 31,8 a 53,1  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g}$  (59,8% do máximo atingível a 134 °C). A gliciteína, o menor componente, atingiu 6,5  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g}$  (68% do máximo atingível a 134 °C). Além disso, o aumento do rendimento em agliconas, pela autoclavagem a 134 °C, resultou em um produto de cor acastanhada (marrom escuro), a opção foi autoclavar à temperatura menor, 125 °C, obtida por interpolação linear no intervalo entre 121 e 134 °C. Nessa temperatura, os grãos ficaram com um conteúdo equivalente de agliconas e aparência natural dos grãos de soja, cujo valor (108,8  $\mu\text{mol} / 100 \text{ g}$ ) está próximo do obtido pelo método de 3 estágios (Hidratação, Incubação e Pré-cozimento).





**Figura 19.** Mudanças cromatográficas ocorridas nos perfis das principais isoflavonas de um lote de amostras de soja tratadas termicamente imediatamente após hidratação pelo PHDC. A) Padrões; B) matéria-prima; C) perfil do produto tratado termicamente a 134 ° C (picos identificados): 1, 2 e 3 são Di, Gli e Gi, respectivamente; 7, 8 e 10 são De, gle, GE, respectivamente; 9 é MGi.



\*intercepção da reta, coordenadas (121 °C, 98.7 μmol/100 g ; 134 °C, 131.8 μmol/100 g) das agliconas totais com o valor de temperatura de 125 °C;  $y = (33.1x - 2722)/13 = 108.89$  (μmol/100 g).

**Figura 20.** Influência da temperatura do tratamento térmico na soja integral no grau de bioconversão entre isoflavonas. Imediatamente após a hidratação, cada lote foi autoclavado na temperatura estipulada e o perfil de isoflavona determinado (base seca).

Em relação ao nível inicial mais baixo de isoflavonas totais encontradas nos grãos brutos, no estado recém-hidratado, acreditamos que seja devido às extrações incompletas antes do tratamento à alta temperatura. Finalmente, em relação ao aumento total de glicosídeo a 105 e 121 °C, da mesma forma, devemos considerar a possibilidade de bioconversões reversas, resultantes dessas temperaturas específicas, na matriz especial de precursores e produtos finais, gerados durante a hidratação controlada. Também é pertinente enfatizar a importância de se reduzir o número de etapas necessárias e obter simultaneamente produtos com o número máximo de atributos de promoção da saúde. Nesse sentido, o pré-processamento de produtos com manipulação mínima e com uma ampla gama de aplicações é sempre uma opção desejável. A hidratação dos grãos de soja pelo processo PHDC, antes do pré-cozimento, oferece também a possibilidade de adicionar, simultaneamente, nutrientes ou aditivos específicos.

## **CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES**

### **1. Processo de Hidratação Diferencial Controlada - PHDC**

O principal objetivo desta pesquisa - o desenvolvimento do Processo de Hidratação Diferencial Controlada (PHDC), sem perdas de sólidos solúveis para a produção de Soja Integral Pré-cozida com Alto Teor de Agliconas, foi conseguido. A incorporação do PHDC na operação unitária de hidratação do processo convencional mostrou ser totalmente compatível e necessária para a produção de alimentos de conveniência funcionais de alta biodisponibilidade, resultando no desenvolvimento de uma tecnologia inovadora de hidratação de fácil implementação em escala industrial e com grande potencial de aplicação. Os testes experimentais confirmaram a hipótese da hidratação dos grãos sem perdas de sólidos solúveis por lixiviação, introduzindo os novos conceitos – Hidratação Diferencial Controlada (PHDC), Volume Efetivo ( $V_{\text{eff}}$ ) e o Fator de Correção do Volume Efetivo ( $f_{V_{\text{eff}}} = 0.85$ ) – e permitindo a otimização do processo em função das variáveis operacionais de maior influência, isto é, a velocidade de rotação e a temperatura do solvente. Essa tecnologia constitui uma inovação incremental de grande importância, visando o desenvolvimento de uma nova linha de pesquisa à base de matérias-primas vegetais.

### **2. Desenvolvimento e Construção do PHDC-Rotator**

Foi construído o equipamento de laboratório denominado PHDC-Rotator que incorporou os conceitos do PHDC, promovendo a hidratação rápida e uniforme dos grãos sem sobrenadante, devido à formação de um filme de solvente em equilíbrio dinâmico (sistema grãos/solvente). O PHDC-Rotator, além da função principal de hidratar, permite também incubar, inativar enzimas, pasteurizar e agregar substâncias solúveis às matérias-primas (vitaminas, minerais, corantes, temperos, antioxidantes etc.), entre outros.

### **3. Otimização**

A otimização do processo de hidratação, incubação e tratamento térmico (processo de 3 estágios), assim como o processo de hidratação e tratamento térmico em quatro níveis de temperaturas (2 estágios), devido à complexidade das variáveis e combinações, requereu o uso da metodologia matemática, RSM (*Response Surface Methodology*), que mostrou ser uma ferramenta adequada e eficiente para a análise dos dados e a otimização do processo. O tempo de hidratação menor que 60 minutos correspondeu à temperatura de 80 °C e

velocidades entre 10 a 15 RPM. A matéria-prima apresentou pequenas quantidades de isoflavonas agliconas ( $10.23 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), porém a hidratação provocou uma mudança significativa no perfil das isoflavonas. Houve uma redução drástica na quantidade de isoflavonas glucosídicas e malonil glucosídicas e um aumento na quantidade de isoflavonas agliconas que alcançaram valores de até  $185.87 \mu\text{g.g}^{-1}$  nas condições de  $55^\circ\text{C}$  e 15 rpm. As superfícies de resposta mostraram uma área de máximo localizada na faixa de temperatura entre  $50$  a  $68^\circ\text{C}$  e velocidades entre 10 a 15 RPM; mais propriamente, a otimização do processo correspondeu às condições de  $54^\circ\text{C}$  e 15 rpm.

#### 4. Incubação

Aumentando-se o tempo de incubação das amostras hidratadas pelo PHDC, foi possível aumentar a quantidade de agliconas produzidas pela hidrólise enzimática das  $\beta$ -glucosidases endógenas da soja, alcançando um valor máximo após 12 horas. Houve uma redução da quantidade de isoflavonas glucosídicas e um aumento da quantidade de agliconas durante a incubação, mostrando que esta é necessária para continuar a hidrólise enzimática e maximizar a taxa de conversão daquelas formas químicas. A combinação do processo de hidratação controlada em condições ótimas de atividade da endoenzima ( $54^\circ\text{C}$  / 15 rpm / 60 minutos) com a incubação permitiu aumentar a quantidade de isoflavonas agliconas iniciais de  $3,76 \mu\text{mol} / 100 \text{ g}$  para o ponto final de  $95.2 \mu\text{mol}/100 \text{ g}$ , representando um aumento de 25.32 vezes, ou para converter, aproximadamente, 51% das formas glicosídicas totais em agliconas.

#### 5. Pré-cozimento a $121^\circ\text{C}$

Os tempos de incubação e tratamento térmico, nas condições otimizadas do PHDC, aumentaram a biodisponibilidade dos produtos, mostrando novas possibilidades de combinações das variáveis na operação unitária de hidratação e cozimento. O tratamento térmico a  $121^\circ\text{C}$  aplicado às amostras hidratadas e incubadas, entre 2 a 12 horas, mostrou que a transformação das isoflavonas glucosídicas em agliconas foi significativa, atingindo um aumento máximo de 25% em 8 horas de incubação. Por outro lado, houve também um aumento das isoflavonas glucosídicas pela transformação das malonil isoflavonas residuais resultantes do PHDC e da incubação. A formação de isoflavonas glucosídicas é muito importante, pois a absorção destas pelos humanos é maior do que as malonil isoflavonas. O

pré-cozimento foi responsável por um aumento médio adicional de agliconas de 14.1 % sobre o ganho obtido no final da etapa de incubação, atingindo 65 % de conversão das formas glucosídicas em agliconas. Vale ressaltar o notável incremento que o processo trouxe para os níveis finais de daidzeína biologicamente importantes, elevando seu conteúdo para 593 vezes a quantidade original encontrada nos grãos *in natura*.

## 6. Tratamento Térmico em 4 Temperaturas

Aumentos adicionais da biodisponibilidade da Soja Integral Instantânea com Alto Teor de Agliconas ocorreram quando os grãos hidratados foram tratados termicamente em quatro níveis de temperaturas selecionadas: 105, 115, 121 e 134 °C. Na temperatura mais baixa (105 °C), o rendimento total de agliconas aumentou para 75% do rendimento no máximo nível do tratamento térmico (134 °C). Por sua vez, a daidzeína representou 87,7% e a genisteína 68% do total atingível a 134 °C. Essa grande conversão, representando 58% do teor total de isoflavona da soja, devido ao efeito combinado da hidratação dos grãos e do tratamento térmico, provou que a autoclavagem é a maneira mais adequada para obter uma hidrólise significativa. O tratamento térmico da soja hidratada a 125 °C por 5 minutos pode substituir o processo de 3 estágios que inclui a hidratação, incubação e pré-cozimento, resultando em valores de conversão equivalentes (108,8  $\mu\text{mol}$  / 100 g). As transformações das isoflavonas em agliconas no pré-cozimento foram complementares, pois propiciaram a conversão parcial das formas ou derivados maloni-isoflavonas glucosídicas residuais em isoflavonas glucosídicas.

## **7. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS**

O desenvolvimento do PHDC representa uma inovação diferencial que deve substituir completamente a hidratação convencional dos grãos em geral, devido ao controle da velocidade de hidratação, à retenção total dos sólidos solúveis, e também por modificar as características nutricionais, funcionais e sensoriais dos grãos, através do enriquecimento e/ou reposição de micronutrientes (vitaminas, minerais, antioxidantes, *flavors* etc.). Em função dos resultados obtidos, sugerimos continuar esta nova linha de pesquisa, explorando os aspectos elencados a seguir.

### **8. Cinética de hidratação**

Estudar novos modelos matemáticos de hidratação dos grãos pelo PHDC, considerando as variáveis relacionadas com a matéria-prima (tamanho de partículas, composição centesimal, tempo de armazenamento etc.), a geometria do sistema (cilíndrico, esférico, quadrado, tipo e posição dos misturadores etc.) e as variáveis operacionais (temperatura, velocidade de rotação, tipo e inclinação das pás do misturador, adição total ou gradual das soluções de hidratação etc.).

### **9. Incorporação de sólidos solúveis**

Realizar estudos de enriquecimento e/ou reposição de micronutrientes e substâncias funcionais e sensoriais (vitaminas, minerais, pigmentos, antioxidantes, corantes, peptídeos, enzimas, saponinas, inibidores de proteases, lectinas, peptídeos, oligossacarídeos, ácidos, bases etc.), utilizando o solvente como veículo durante a hidratação pelo PHDC.

### **10. Vantagens do PHDC em relação aos métodos convencionais de hidratação**

Realizar estudos comparativos sobre as vantagens do uso do PHDC em relação aos processos convencionais de hidratação nos diversos tratamentos (incubação, tratamento térmico, químico, enzimático etc.) nas propriedades nutricionais, funcionais e sensoriais dos alimentos de conveniência e outros derivados à base de grãos.

## CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS

AGUIAR, C. L. Effects of the Processing Techniques on Isoflavone Profiles: A review. In: Isoflavones: Biosynthesis, occurrence and health effects. pp. 225–237, 2010. **Melanie J Thompson, Ed., Nova Publishers, USA.**

AGRICULTURE, U. S. D. O. **World Agricultural Supply and Demand Estimates. (In)**, 2015.

ARTIGOT, M.-P., et al. Expression of flavonoid 6-hydroxylase candidate genes in normal and mutant soybean genotypes for glycitein content. **Molecular biology reports**, 40(7), 4361-4369, 2013.

BAIANO, A. Effects of Processing on Isoflavone Content and Profile in Foodstuffs: A Review. In: Isoflavones: Biosynthesis, occurrence and health effects. pp. 111–135, 2010. **Melanie J Thompson, Ed., Nova Publishers, USA.**

BARNES, S. The biochemistry, chemistry and physiology of the isoflavones in soybeans and their food products. *Lymphatic research and biology*, 8(1), 89-98, 2010.  
CASSIDY, A., et al. Critical review of health effects of soybean phyto-oestrogens in post-menopausal womwn. **Proceedings of the Nutrition Society**, Volume 65, Issue 01, 76-92, 2006.

CHIEN, J. T. et al. Kinetic model for studuing the conversion and degradation of isoflavones during heating. **Food Quemistry**.91, 425-434, 2005.

DAVIS, T. A. et al. Genistein induces radioprotection by hematopoietic stem cell quiescence. **Int. J. Radiat. Biol.** 84:713–726, 2008.

DINELLI, G. et al. Content of flavonols in Italian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ecotypes. **Food Chemistry**, 99, 105-114, 2006.

DIXON, R. A., & STEELE, C. L. Flavonoids and isoflavonoids a gold mine for metabolic engineering. **Trends in plant science**, 4(10), 394-400,1999.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação do teor de isoflavonas de “suplementos nutricionais à base de soja” **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 39, n. 2, abr./jun, 2003.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Isoflavonas da soja.: fatores que influem nos tipos e teores em alimentos. **Food Ingred.**, v. 11, p. 62-64, 2001.

GÓES-FAVONI, S. P., CARRÃO-PANIZZI, M. C., & BELEIA, A. Changes of isoflavone in soybean cotyledons soaked in different volumes of water. **Food Chemistry**, 119(4), 1605-1612, 2010.

GÓES-FAVONI, S. P. et al. Isoflavones em produtos comerciais de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 24, 582-586, 2004.

GÓES-FAVONI, S. P. et al. Teor de agliconas em grãos de soja submetidos a tratamento hidrotérmico. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 6., 2005, Resumos. Campinas: **UNICAMP/FEA: SBCTA**.

GIOVANNI, M. Response Surface Methodology and product optimization. **Food Technol. (Chicago)** 37(11):41-45,83, (1983).

HAKAMATSUKA, T. et al. Purification of 2-Hydroxyisoflavanone Dehydratase from the Cell Cultures of Pueraria Lobata in Honour of Professor GH Neil Towers 75TH Birthday. **Phytochemistry**, 49(2), 497-505, 1998.

FARFAN-AMAYA, J. Alternative foods: a critical analysis of a proposal for nutritional intervention - **Cadernos de Saúde Pública**, - **SciELO Brasil**, 1998.

JACKSON, C. J. C. et al. Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. **Process Biochem.** 37:1117–1123, 2002.

MANCHÓN, N. et al. Fast analysis of isoflavones by high-performance liquid chromatography using a column packed with fused-core particles. **Talanta**, 82(5), 1986-1994, 2010.

MOUBARAC, J-C. et al. Food Classification Systems Based on Food Processing: Significance and Implications for Policies and Actions: **A Systematic Literature Review and Assessment. Curr Obesity Rep**, DOI 10.1007/s13679-014-0092-0, 2014.

MUKHERJEE, R., CHAKRABORTY, R., & DUTTA, A. Soaking of soybean meal: evaluation of physicochemical properties and kinetic studies. **Journal of Food Measurement and Characterization**, 13:390–403, 2019.

NAIM, M. et al. Soybean isoflavones: characterization, determination, and antifungal activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 806-810, 1974,

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). Antioxidants and cancer prevention: Fact sheet. Retrieved November 18, 2008, 2004. from **<http://www.nci.nih.gov/cancertopics/factsheet/antioxidantsprevention>**.

NATIONAL SOYBEAN RESEARCH LABORATORY (NSRL), 2013.

NETO, N. B, SCARNIO, I.S., BRUNS, R.E. Planejamento e Otimização de Experimentos. **Editora UNICAMP. Campinas**, SP, 1996.

OKABE, Y., SHIMAZU, T., & TANIMOTO, H. Higher bioavailability of isoflavones



after single ingestion of aglycone-rich fermented soybeans compared with glucoside-rich non-fermented soybeans in Japanese postmenopausal women. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 91(4), 658-663, 2011.

Pananun, et al. High-power ultrasonication-assisted extraction of soybean isoflavones and effect of toasting. **Food Sci. Tech.** 47:1999–2007.

PATEL, R. P. et al. Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: Paradoxical effects of peroxy radical scavenging. **Free Radic. Biol. Med.** 31:1570–1581, 2001.

ROSSI, E.A. et al. Determinação de isoflavonas nas diversas etapas do processamento do "Iogurt" de soja. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.15,n, p. 93-99, 2004.

ROSTAGNO, M. Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. *Journal of Chromatography A*, 1216(1), 2-29, 2009.

ROSTAGNO, M. C. A., PALMA, M., & BARROSO, C. G. Short-term stability of soy isoflavones extracts: Sample conservation aspects. **Food Chemistry**, 93(3), 557-564, 2005.

ROSTAGNO, M., PALMA, M., & BARROSO, C. Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans. **Analytica Chimica Acta**, 522(2), 169-177, 2004.

ROSTAGNO, M. A., PALMA, M., & BARROSO, C. G. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. **Journal of Chromatography A**, 1012(2), 119-128, 2003.

SALCES, F. R. Feijão Integral Instantâneo: Estudo das Condições Críticas do Processo. Relatório- PIPE- Fase I. **FAPESP**. Proc.:01/03440-4 Campinas, S., 1994.

SALCES, F. R., ROSTAGNO M. A. & AMAYA-FARFAN, J. Novel process of hydration, followed by thermal treatment for high isoflavone bioconversion in soybeans. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.040>, 2018.

SETCHELL, K. D. et al. S-equol, a potent ligand for estrogen receptor  $\beta$ , is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 81(5), 1072-1079, 2005.

SETCHELL, K. D., CASSIDY, L. A. **The Journal of Nutrition**, Volumen 129, número 3, p 758S – 767S, 1999.

**SOJA**. Ilsi Brasil International Life Sciences Institute do Brasil – **Série de publicações**

**ILSI Brasil: Alimentos com Propriedades Funcionais e/ou de saúde – Vol. 2**, 2007.

41. STATISTICA: (Data Analysis Software System); [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).

THAM, D., GARDNER, C. AND HASKELL, W. Potential health benefits of dietary phytoestrogens: A review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. **J. Clin. Endocrinol. Metabol.** 83:2223–2235, 1998.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). World Agricultural Supply and Demand Estimates: WASDE- 504, 2012. ISSN: 1554–9089. [www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf](http://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf)

UZZAN, M., NECHREBEKI, J. AND LABUZA, T. P. Thermal and storage stability of nutraceuticals in a milk beverage dietary supplement. **J. Food Sci.** 72:E109–E114, 2007.

WANG, H.J. Quantification of potentially anticarcinogenic isoflavones in soy foods and the effect of processing on the composition of isoflavones. **Dissertation Abstract Intern.**, V.55, n. 7, 128p, 1995.

VITALE, D. C. et al. Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. **European journal of drug metabolism and pharmacokinetics**, 38(1), 15-25, 2013.

WANG, H. J., & MURPHY, P. A. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44(8), 2377-2383, 1996.

WANG, H.J. Quantification of potentially anticarcinogenic isoflavones in soy foods and the effect of processing on the composition of isoflavones. **Dissertation Abstract Intern.**, V.55, n. 7, 128p, 1995.

YERRAMSETTY, V., GALLAHER, D. D., & ISMAIL, B. Malonylglucoside Conjugates of Isoflavones Are Much Less Bioavailable Compared with Unconjugated  $\beta$ -Glucosidic Forms in Rats. **The Journal of nutrition**, 144(5), 631-637, 2014.

ZAHEER K, AKHTAR M.H. An updated review of dietary isoflavones: Nutrition, processing, bioavailability and impacts on human health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 57(6), 1280-1293, 2017.

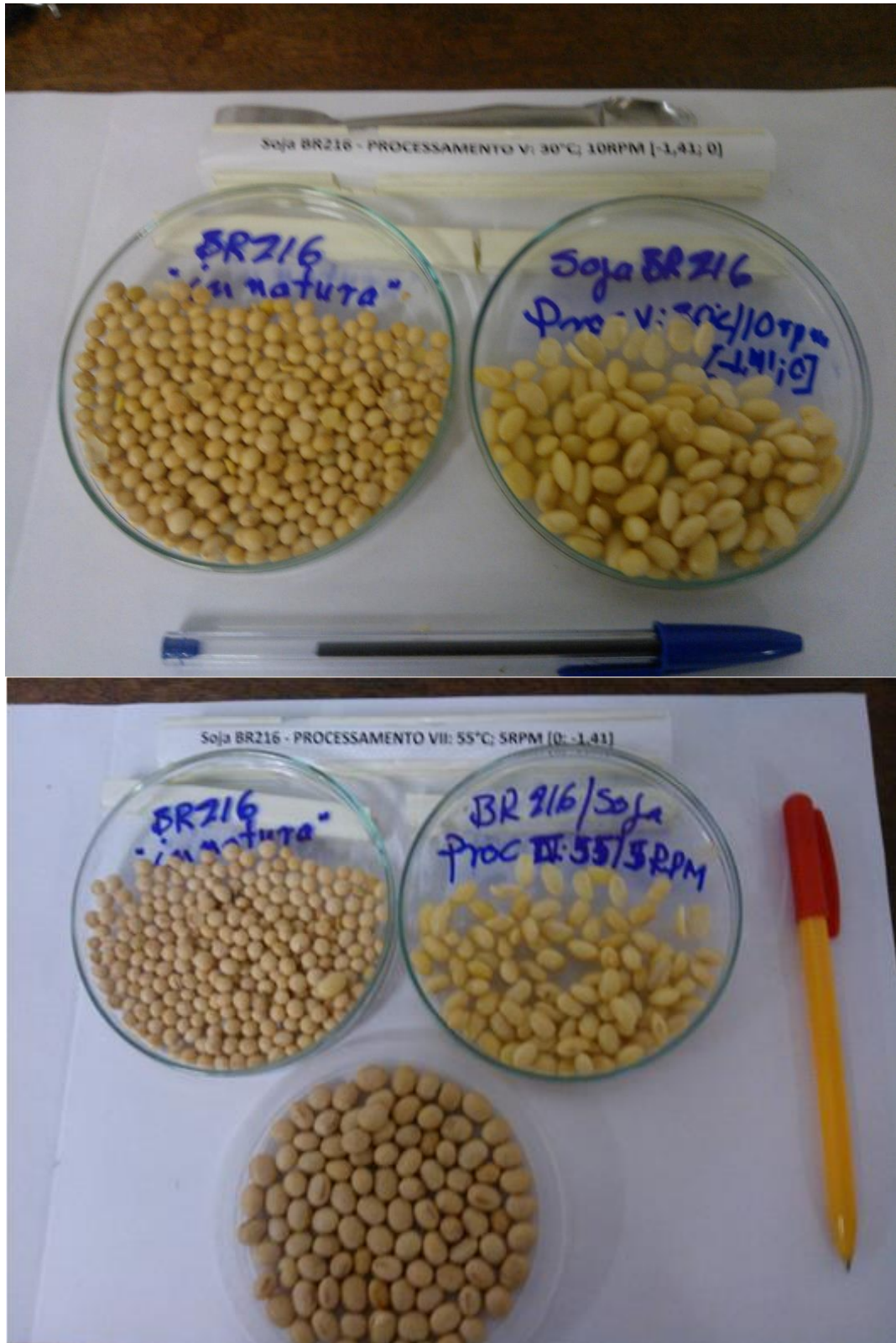
## **ANEXOS**

**ANEXO I.****1.1 PHDC-Rotator - Equipamento experimental Escala de Laboratório.**

## ANEXO II.

## MATÉRIA-PRIMA

## 2.1 Figura 21. Cultivar de Soja BRS 216- produzida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA



## ANEXO III.

**3.1 Determinação do fator de redução ( $f_{\text{veff}}$ ) do volume efetivo de hidratação ( $V_{\text{eff}}$ )****MI-Testes preliminares de hidratação convencional (estática) da soja**Determinação do Volume Equivalente ( $V_{\text{eq}}$ )

Matéria Prima : Soja BR216

Lavagem dos Grãos: lavagem rápida (30 segundos) água potável.

A= 100 g

S= 300 ml (água potável)

T°C= Temperatura Ambiente

Hidratação: Os grãos de soja, após lavagem rápida, foram macerados com água na relação de 1:3, grãos/água à temperatura ambiente entre 1 a 12 h. Os resultados estão expostos na Tab 6.

Nomenclatura:

$V_{\text{AbsMx}}$ : Volume de Absorção Máxima(ml) determinado pelo método convencional (24horas/TAmbiente/1:3; Grãos: Água)

$V_{\text{eff}}$ : Volume Equivalente (ml) Efetivo absorvido em função do tempo à temperatura ambiente.

$V_{\text{if}}$ : Volume Intersticial Final (ml), Volume de água entre os grãos hidratados.

$V_{\text{res}}$ : Volume Residual (solvente), diferença entre o  $V_{\text{AbsMx}}$  e o Volume de água absorvida( $V_{\text{eff}}$ ) em função do tempo das condições de trabalho (temperatura, velocidade de rotação, tipo de matéria prima, etc) e da metodologia de hidratação usada (convencional estática, PHDC, etc)

$t_{\text{Abs}}$ : tempo de Absorção em função das condições de trabalho (temperatura, rotação, etc).

$f_{\text{eff}}$ : fator de correção do Volume de Absorção Máxima ( $V_{\text{max}}$ ).

Tabela 6. Absorção Máxima versus Volume Residual – Sistema Estático ( $T_{\text{amb}}$ )

Teste	AbsMax (ml)	* $V_{\text{if}}$ (ml)	$t_{\text{Abs}}$ (h)	$V_{\text{eff}}$ (ml)	$V_{\text{res}}$ (ml)	$\text{Rel} = V_{\text{eff}}/\text{AbsMx}$	Observações
1	130	125	4	119	11	0,92	Redução de 8,5% do $V_{\text{eff}}$
2	130	125	12	120	10	0,92	Redução de 8,5% do $V_{\text{eff}}$
3	130	125	16	124,8	5,2	0,96	Redução de 4,0% do $V_{\text{eff}}$
4	130	125	24	129,3	0,7	0,99	Redução de 0,5% do $V_{\text{eff}}$

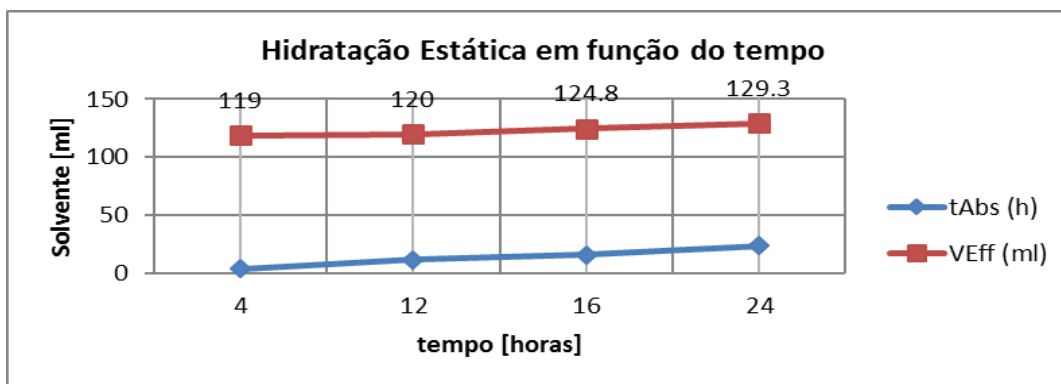
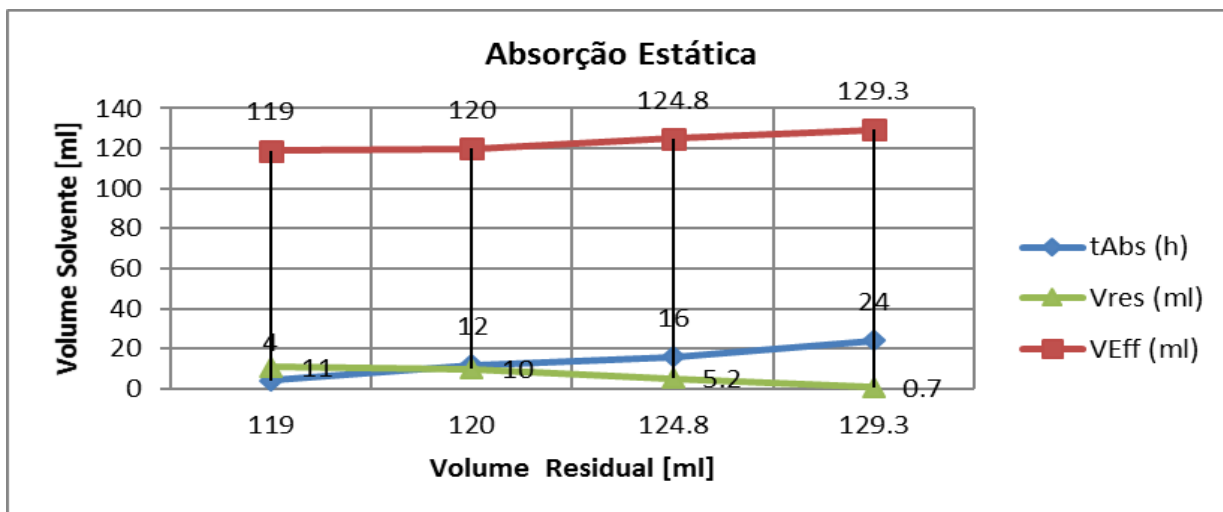
\* sobrenadante após hidratação máxima (12 h a  $t_{\text{amb}}$ )

Figura 22. Hidratação Estática em função do tempo





**Figura 23. Hidratação Estática e Volume Residual ( $V_{res}$ ) em função do tempo ( $t_{Abs}$ )**

### 3.3 II- Cálculos do percentual de solvente residual em relação ao $V_{eff}$

A absorção de água dos grãos de soja utilizando o método convencional de hidratação atingiu a faixa de umidade adequada para fins do processamento por via úmida, que fica entre 80 a 90 %, em aproximadamente 4 horas, sendo que o aumento entre 4 e 12 horas não foi significativo (0,8%). O incremento entre 4 e 24 horas foi de apenas 4,7%. Por outro lado, observamos que a percentagem de água não absorvida (volume residual) em relação à absorção máxima (130 ml) determinada pelo método convencional (12 horas à temperatura ambiente) foi de cerca de 20%. Esta água continha uma grande parte dos sólidos solúveis lixiviados; este nível de absorção foi adotado como base para a determinação do fator de redução do  $V_{eff}$  teórico. Como pode ser verificado na Figura 22, a absorção, a partir desse nível, se tornou muito lenta; assim, para atingir 99% da absorção, foram necessárias mais 20 horas. A partir desse ponto, o aumento da absorção mostrou um comportamento assintótico, com aumentos relativamente pequenos em tempo longos.

Em função dessas observações e, considerando que o nível de absorção adequado para as operações posteriores de incubação e tratamento térmico não precisa ser superior a 60%, realizamos testes experimentais visando determinar um fator de redução do volume da absorção máxima, que permita o esgotamento total do volume efetivo ( $V_{eff}$ ), ou seja, que o volume residual seja zero no menor tempo possível (Figura 23). Para a determinação do fator de redução do volume, denominado  $f_{eff}$ , foram realizados os testes experimentais mostrados na Tabela 7. É

importante ressaltar que para a determinação do fator de redução do volume foram utilizados os dados determinados no processo convencional de hidratação; entretanto, os testes experimentais foram realizados através do processo dinâmico de hidratação diferencial controlada (PHDC) que constitui o objetivo principal desta pesquisa. Conforme constatado anteriormente, o PHDC mostrou ser mais eficiente em relação ao processo convencional, por ser um processo dinâmico. As variáveis Velocidade e Temperatura foram fixadas em 4 rpm e 80 °C, respectivamente, por serem o menor nível de velocidade e a maior temperatura operacionais, dentro do planejamento experimental predeterminado.

### **3.4 III- Determinação do fator de redução do volume efetivo ( $V_{eff}$ )**

O fator de redução ( $fV_{eff}$ ) foi determinado a partir da relação entre a absorção máxima na hidratação estática e a hidratação dinâmica (PHDC). Esse fator mede o tempo necessário para que o  $V_{eff}$  seja absorvido totalmente, ou seja, para que o sobrenadante seja zero. O objetivo desse fator é determinar o tempo mínimo de absorção total com todos os sólidos solúveis no interior dos grãos. A absorção máxima no sistema estático, para a matéria prima adotada, foi de aproximadamente 130 ml em cerca de 12 horas. A partir desse valor, foram realizados testes preliminares, nas condições estabelecidas no delineamento estatístico, que mostraram resíduo zero no sistema dinâmico (PHDC).

Os testes preliminares mostraram que, para que a hidratação dinâmica seja rápida e eficiente, sem prejudicar os tratamentos posteriores, como a incubação e tratamento térmico, os grãos de soja deveriam ser hidratados em níveis menores que a hidratação de referência ou volume de absorção máxima ( $V_{AbsMáx}$ ). Foi determinado que, para obter maior eficiência na incubação e no tratamento térmico, a hidratação dos grãos deve ficar na faixa de 80 a 90%. Em função desses resultados, para a determinação do fator de redução do volume de água, foram realizados testes experimentais, iniciando com uma redução de 20% ( $f_{eff} = 0,80$ ) do volume de  $V_{AbsMáx}$  (130 ml/100gramas de grãos) no sistema estático. Os resultados estão mostrados na Tabela 7.

Após a aplicação do fator de redução do volume efetivo, foram observadas as características físicas da eficiência da hidratação. A parte plana dos cotilédones, com hidratação adequada, mostrou-se totalmente liso (hidratação completa); por outro lado, os cotilédones com hidratação deficiente mostraram superfícies côncavas (hidratação incompleta). Outro indicativo



foi a lixiviação dos sólidos solúveis durante a hidratação na água de maceração. A redução do volume efetivo ( $V_{\text{eff}}$ ) mostrou que a hidratação dos grãos com volumes menores de água evitaram a saída dos sólidos solúveis do interior dos grãos, e o sobrenadante ficou de cor límpida.

### 3.5 IV- Aplicação do fator $f_{\text{Veff}}$ (0,85) no Processo de Hidratação Diferencial Controlada PHDC

Baseados nos resultados obtidos no processo de hidratação estática, realizamos testes de aplicação do fator ( $f_{\text{Veff}}$ ) para a redução do volume efetivo ( $V_{\text{eff}}$ ), utilizando o PHDC nas condições de temperatura máxima (80 a 90 °C) e rotação constante de 4 rpm (Tabela 7). Os resultados mostraram que para  $f_{\text{Veff}} = 0,85$  a hidratação dinâmica foi mais eficiente em comparação com a hidratação estática ou convencional, pois além de evitar a perda dos sólidos solúveis dos grãos, atingiu o nível adequado de umidade necessário para posteriores processamentos, seja para uso direto na forma de grãos pré-cozidos, ou para uso indireto na elaboração de produtos derivados.

**Tabela 7. Testes de determinação do fator de redução do volume efetivo ( $V_{\text{eff}}$ )**

Teste	T(°C)	th (h)	$V_{\text{eff}}$ (ml)	$V_{\text{res}}$ (ml)	$\text{Rel}(V_{\text{eff}}/V_{\text{absm}})$	Observações
1	Amb	4	$100 + 30 = 130$	5	$125/130 = 0,96$	$f_{\text{Veff}} = 1$
2	80	2	$70 + 50 + 30 = 130$	5,4	$124,6/130 = 0,96$	$f_{\text{Veff}} = 1$ (BR216)
3	90	2	130	0	$130/130 = 1,00$	$f_{\text{Veff}} = 1$
4	80	1:20	$130 * 0,8 = 104$	3,2	$100,8/104 = 0,96$ [ $100,8/130 = 0,77$ ]	$f = 0,8$
5	80	2:15	$130 * 0,85 = 110,5$	0	$110,5/110,5 = 1,00$ [ $100,8/130 = 0,77$ ]	Melhor resultado = $f_{\text{Veff}} = 0,85$
6	80	2	$130 * 0,85 = 110,5$	0	$110,5/110,5 = 1,00$ [ $110,5/130 = 0,85$ ]	$f_{\text{Veff}} = 0,85$ Repetição do teste anterior com redução do tempo p 2 horas.
7	80	2	$130 * 0,85 = 110,5$	1(0)	$109,5/110,5 = 1,00$ [ $110,5/130 = 0,85$ ]	$f_{\text{Veff}} = 0,85$
8	80	2	$130 * 0,85 = 110,5$	0,5	$(110/110,5) = 1(0,99)$ $(110,5/130) = 0,85$	$f_{\text{Veff}} = 0,85$
Média (6+7+8)	80	2	110,5	0,5	$1 + 1 + 0,99 = 0,997 = 1$ $110,5/130 = 0,85$	$f_{\text{Veff}} = 0,85$

Os resultados mostraram que, para valores fixos da velocidade de rotação, a temperatura,

a forma de adição da água e o volume efetivo ( $V_{eff}$ ) influenciaram na absorção. No processo convencional ou estático, a temperatura foi a variável de maior influência na absorção da água; entretanto, a adição da água fracionada, em volumes de até três vezes, afetou negativamente a absorção, mostrando que a melhor opção para reduzir o  $V_{res}$  para zero e, conseqüentemente, o tempo de hidratação, foi a adição total do  $V_{eff}$  no início da hidratação. Os testes posteriores utilizando o  $fV_{eff} = 0,85$  (Tabela 8) mostraram que este fator foi eficiente para a determinação das variáveis de maior influência na hidratação dinâmica.

**Tabela 8. Testes de verificação do fator de redução ( $fV_{eff}=0,85$ ) do Volume efetivo ( $V_{eff}=130$ ) na hidratação no PHDC-Rotator nas condições do Planejamento Experimental**

Testes	tH (h)	Vres (ml)
1. 37°C/7rpm	4:00	0
2. 73°C/10rpm	2:00	0
3. 80°C/10rpm	0:45	0
4. 55°C/10rpm	1:45	0

## ANEXO IV.

## Submissão do Artigo II.

Elsevier Editorial System(tm) for LWT - Food  
Science and Technology  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Accelerated Bioconversion of Isoflavones in Whole Soybeans using  
Controlled Hydration and Thermal Treatment

Article Type: Short communication

Keywords: Thermal hydrolysis  
Bioactives  
Convenience foods  
 $\beta$ -Glucosidase  
Dehydration

Corresponding Author: Professor Jaime Amaya-Farfan, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Unicamp

First Author: Franz R Salces, MSc

Order of Authors: Franz R Salces, MSc; Mauricio A Rostagno, PhD; Jaime  
Amaya-Farfan, Ph.D

Suggested Reviewers: Ana Lante Ph.D.  
Faculty member, Department of Agronomy, Food, Natural Resources, Animals  
& Environment, University of Padova, Viale dell'Università 16, 35020,  
Legnaro, PD, Italy  
anna.lante@unipd.it  
Has coauthored publications in the area of isoflavones

MARIO A da CUNHA Ph.D.  
Faculty member, Chemistry Dept, Univ Tecnol Fed Parana, Via  
Conhecimento, Km 01, BR-85503390 Pato Branco, PR, Brazil  
mcunha@utfpr.edu.br  
Specialist in soybean processing

DIANA Di GIOIA Ph.D.  
Professor, Dept Agr Sci, Alma Mater Studiorum Univ Bologna, I-40127  
Bologna, Italy  
diana.digioia@unibo.it  
Knowledge in isoflavone in grains

Specialist in soybean processing

DIANA Di GIOIA Ph.D.  
Professor, Dept Agr Sci, Alma Mater Studiorum Univ Bologna, I-40127  
Bologna, Italy  
diana.digioia@unibo.it  
Knowledge in isoflavone in grains

## ANEXO V.

#### 4.1 Identificação das isoflavonas através da comparação dos tempos de retenção dos espectros de absorção ultravioleta dos compostos separados

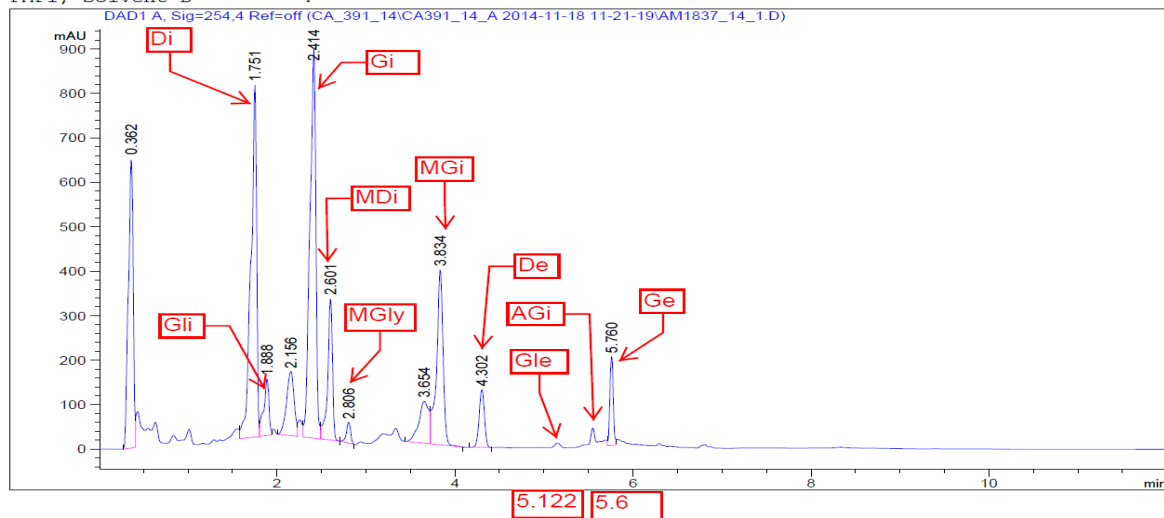
Data File C:\CHEM32\2\DATA\CA\_391\_14\CA391\_14\_A 2014-11-18 11-21-19\AM1837\_14\_1.D  
Sample Name: Am 1837\_14

```
=====
Acq. Operator   : Central Analítica          Seq. Line :    8
Acq. Instrument : HPLC_1260_DAD_CA           Location  : Vial 7
Injection Date  : 11/18/2014 2:10:53 PM      Inj       :    1
                                           Inj Volume: 10.000 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\2\DATA\CA_391_14\CA391_14_A 2014-11-18 11-21-19\CA_391_14.M
Last changed    : 11/18/2014 11:21:19 AM by Central Analítica
Analysis Method : C:\CHEM32\2\METHODS\CA_391_14_PROCESSADO.M
Last changed    : 11/18/2014 3:54:44 PM by Central Analítica
Additional Info  : Peak(s) manually integrated
=====
```

```
Instrument Conditions :      At Start          At Stop
Pressure             :      281.3              283.1 bar
Flow                 :      2.700              2.700 ml/min
```

```
Detector Lamp Burn Times: Current On-Time  Accumulated On-Time
DAD 1, UV Lamp        :      3.17             5336.7 h
```

```
Solvent Description :
PMP1, Solvent A     :
PMP1, Solvent B     :
PMP1, Solvent C     :
PMP1, Solvent D     :
```



#### Area Percent Report

```
Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Data File C:\CHEM32\2\DATA\CA\_391\_14\CA391\_14\_A 2014-11-18 11-21-19\AM1837\_14\_1.D  
 Sample Name: Am 1837\_14

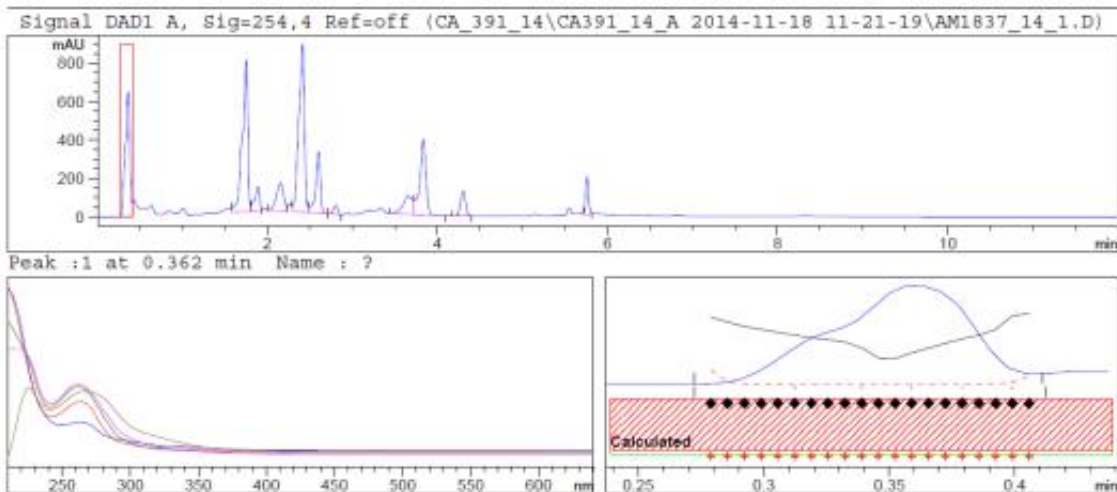
Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	0.362	BV	0.0563	2477.76196	652.63843	14.8342
2	1.751	VV	0.0645	3564.13672	792.60986	21.3383
3	1.888	VV	0.0600	525.64752	127.80901	3.1470
4	2.156	BV	0.0905	850.60773	144.96222	5.0925
5	2.414	VV	0.0666	4098.12305	876.18042	24.5352
6	2.601	VB	0.0559	1199.81116	319.19330	7.1832
7	2.806	BB	0.0503	154.75148	47.12846	0.9265
8	3.654	BV	0.1127	752.38251	94.71001	4.5045
9	3.834	VB	0.0755	2009.97009	394.35608	12.0336
10	4.302	BB	0.0637	532.88055	130.34520	3.1903
11	5.760	VV	0.0433	536.94067	200.07629	3.2146

Totals : 1.67030e4 3780.00929

\*\*\*\*\*

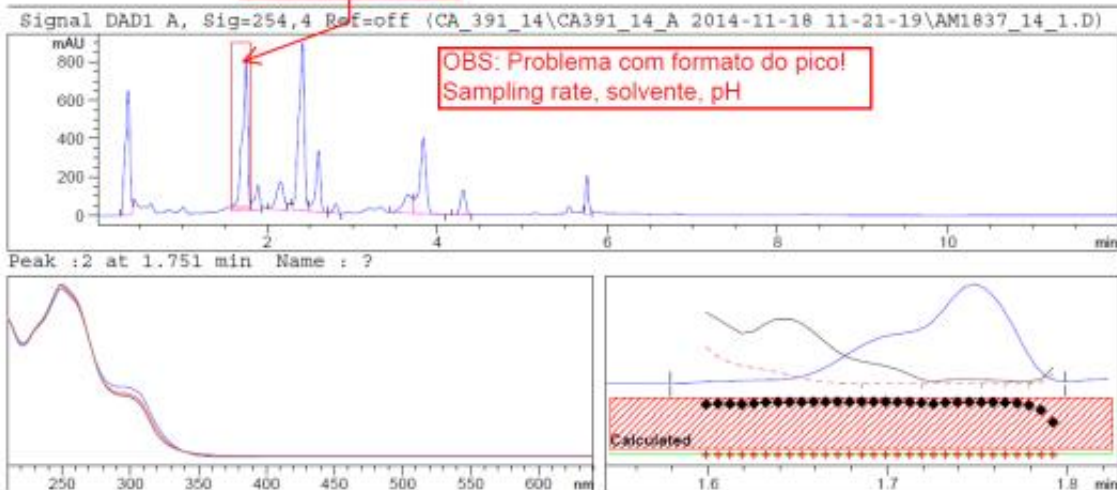
Data File C:\CHEM32\2\DATA\CA\_391\_14\CA391\_14\_A 2014-11-18 11-21-19\AM1837\_14\_1.D  
 Sample Name: Am 1837\_14



-> The purity factor exceeds the calculated threshold limit. <-

Purity factor : 853.363 (20 of 20 spectra exceed the calculated threshold limit.)  
 Threshold : 999.866 (Calculated with 20 of 20 spectra)  
 Reference : Peak start and end spectra (integrated) (0.272 / 0.412)  
 Spectra : 5 (Selection automatic, 5)  
 Noise Threshold: 0.206 (12 spectra, St.Dev 0.0637 + 3 \* 0.0475)  
 Warning : Spectral absorbances > 1000 mAU (see help for more information)

Daizina: TR 1.751



-> The purity factor exceeds the calculated threshold limit. <-

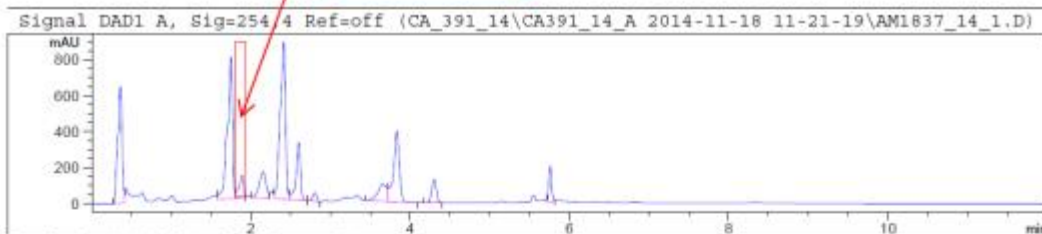
Purity factor : 969.409 (30 of 30 spectra exceed the calculated threshold limit.)  
 Threshold : 999.222 (Calculated with 30 of 30 spectra)  
 Reference : Peak start and end spectra (integrated) (1.579 / 1.799)  
 Spectra : 5 (Selection automatic, 5)  
 Noise Threshold: 0.206 (12 spectra, St.Dev 0.0637 + 3 \* 0.0475)

Pureza de Pico: Excelente

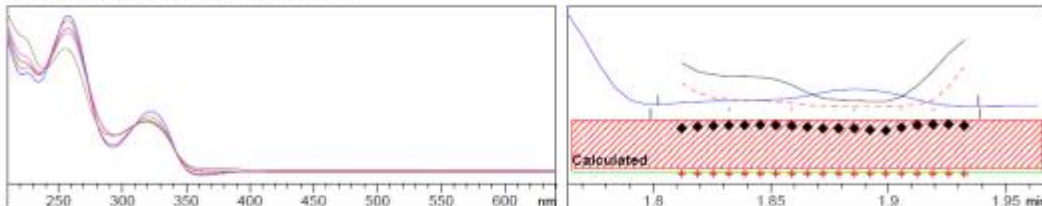


Data File C:\CHEM32\2\DATA\CA\_391\_14\CA391\_14\_A 2014-11-18 11-21-19\AM1837\_14\_1.D  
 Sample Name: Am 1837\_14

Glicitina: TR 1.888



Peak :3 at 1.888 min Name : ?



-> The purity factor exceeds the calculated threshold limit. <-

Pureza de Pico: Excelente

Purity factor : 946.608 (19 of 19 spectra exceed the calculated threshold limit.)

Threshold : 997.061 (Calculated with 19 of 19 spectra)

Reference : Peak start and end spectra (integrated) (1.799 / 1.939)

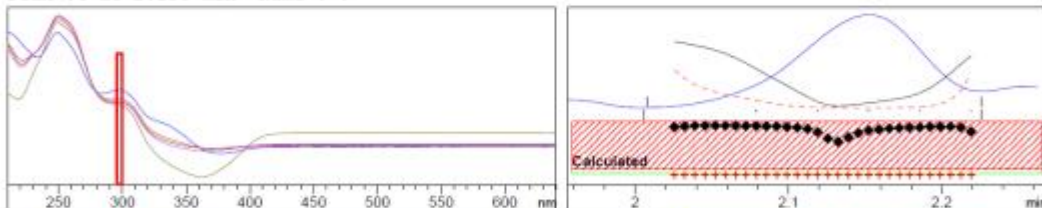
Spectra : 5 (Selection automatic, 5)

Noise Threshold: 0.206 (12 spectra, St.Dev 0.0637 + 3 \* 0.0475)

Composto não identificado



Peak :4 at 2.156 min Name : ?



-> The purity factor exceeds the calculated threshold limit. <-

Purity factor : 884.002 (30 of 30 spectra exceed the calculated threshold limit.)

Threshold : 996.754 (Calculated with 30 of 30 spectra)

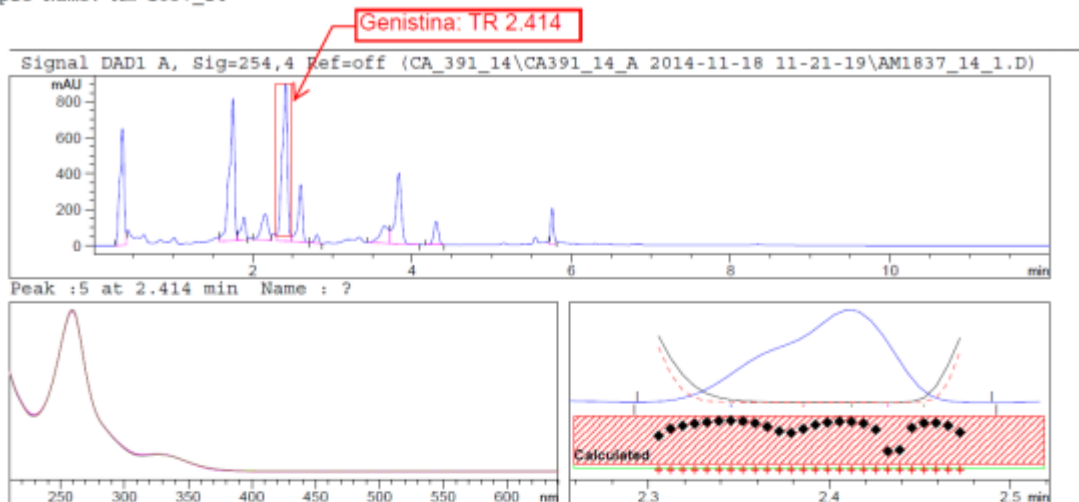
Reference : Peak start and end spectra (integrated) (2.006 / 2.226)

Spectra : 5 (Selection automatic, 5)

Noise Threshold: 0.206 (12 spectra, St.Dev 0.0637 + 3 \* 0.0475)

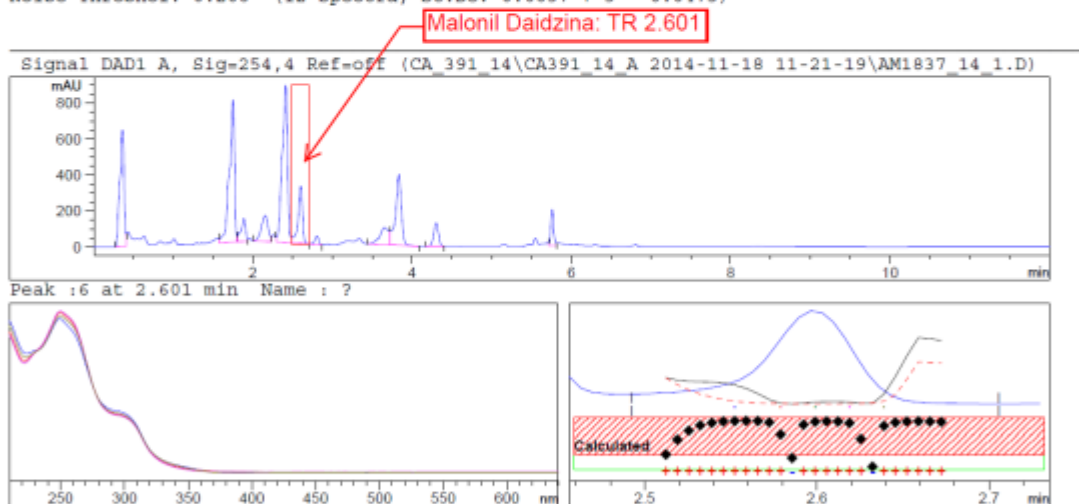
Espectro similar ao da família da daizina mas o máximo do segundo ombro está deslocado para a direita (< 300 nm) em relação ao espectro da daizina (max do segundo ombro em 304 nm)

Data File C:\CHEM32\2\DATA\CA\_391\_14\CA391\_14\_A 2014-11-18 11-21-19\AM1837\_14\_1.D  
 Sample Name: Am 1837\_14



-> The purity factor exceeds the calculated threshold limit. <- **Pureza de Pico: Excelente**

Purity factor : 993.073 (26 of 26 spectra exceed the calculated threshold limit.)  
 Threshold : 997.483 (Calculated with 26 of 26 spectra)  
 Reference : Peak start and end spectra (integrated) (2.292 / 2.492)  
 Spectra : 5 (Selection automatic, 5)  
 Noise Threshold: 0.206 (12 spectra, St.Dev 0.0637 + 3 \* 0.0475)

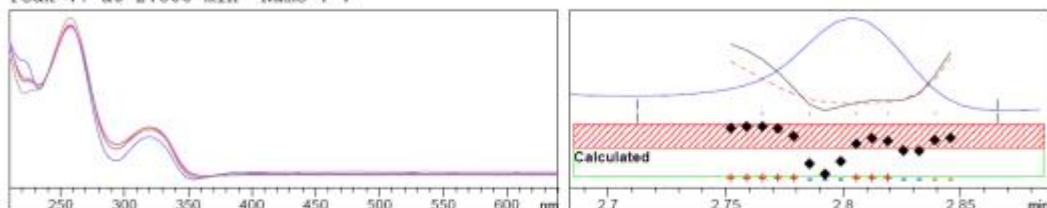
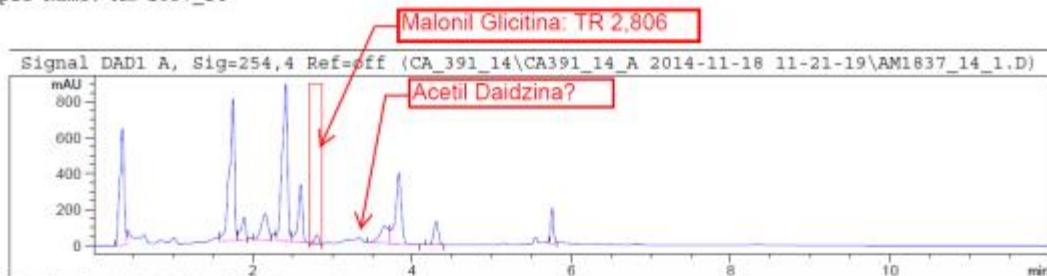


-> The purity factor exceeds the calculated threshold limit. <- **Pureza de Pico: Boa**

Purity factor : 890.003 (23 of 25 spectra exceed the calculated threshold limit.)  
 Threshold : 991.801 (Calculated with 23 of 25 spectra)  
 Reference : Peak start and end spectra (integrated) (2.492 / 2.706)  
 Spectra : 5 (Selection automatic, 5)  
 Noise Threshold: 0.206 (12 spectra, St.Dev 0.0637 + 3 \* 0.0475)

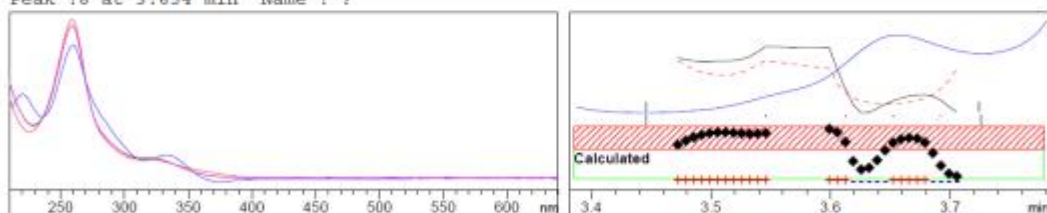


Data File C:\CHEM32\2\DATA\CA\_391\_14\CA391\_14\_A 2014-11-18 11-21-19\AM1837\_14\_1.D  
 Sample Name: Am 1837\_14



-> The purity factor exceeds the calculated threshold limit. <- Pureza de Pico: Boa

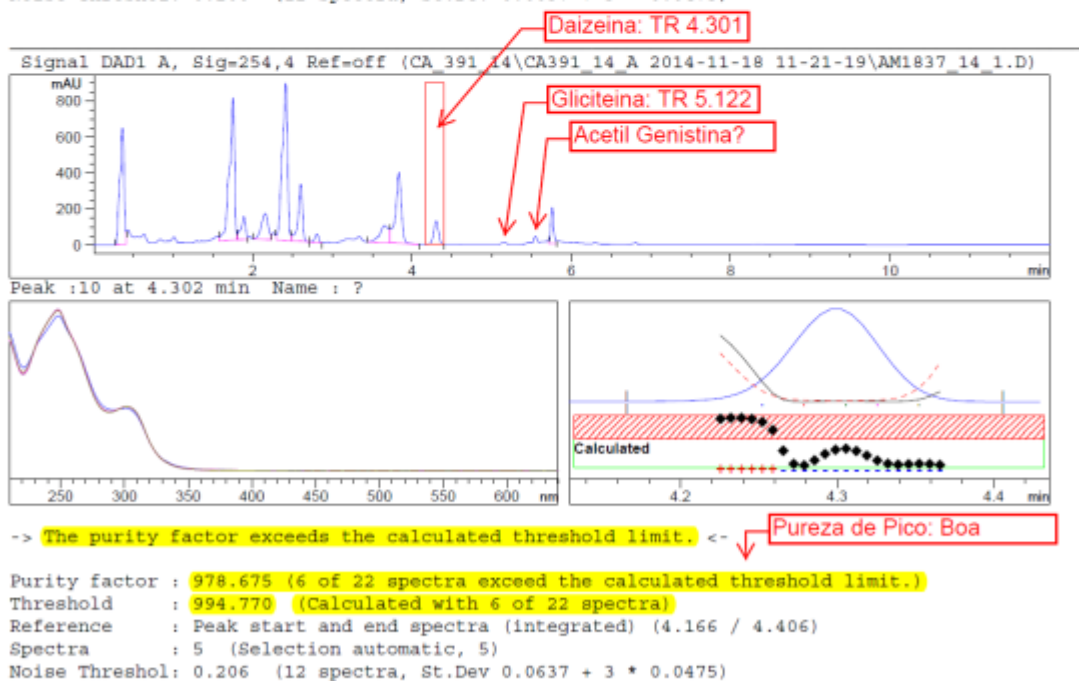
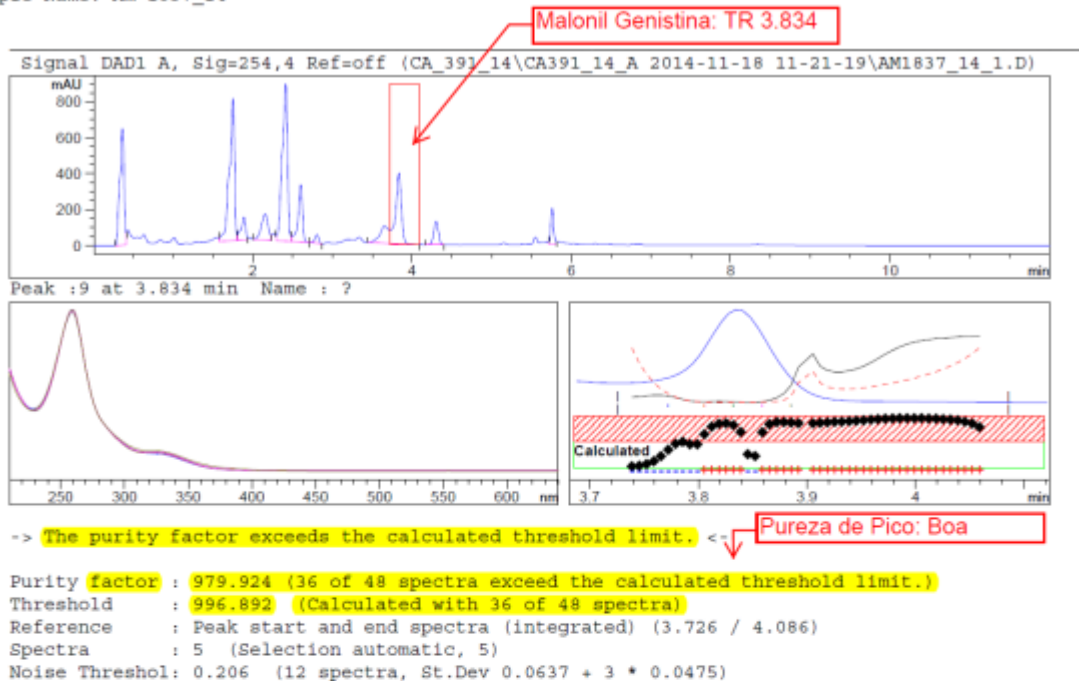
Purity factor : 984.814 (8 of 15 spectra exceed the calculated threshold limit.)  
 Threshold : 995.730 (Calculated with 8 of 15 spectra)  
 Reference : Peak start and end spectra (integrated) (2.712 / 2.866)  
 Spectra : 5 (Selection automatic, 5)  
 Noise Threshold: 0.206 (12 spectra, St.Dev 0.0637 + 3 \* 0.0475)



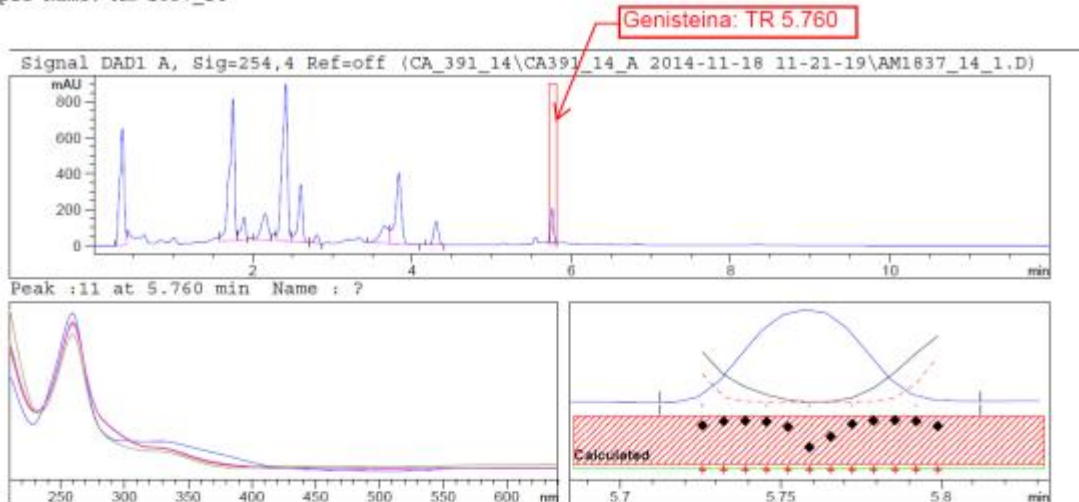
-> The purity factor exceeds the calculated threshold limit. <-

Purity factor : 980.840 (20 of 29 spectra exceed the calculated threshold limit.)  
 Threshold : 991.010 (Calculated with 20 of 29 spectra)  
 Reference : Peak start and end spectra (integrated) (3.446 / 3.726)  
 Spectra : 4 (Selection automatic, 5)  
 Noise Threshold: 0.206 (12 spectra, St.Dev 0.0637 + 3 \* 0.0475)

Data File C:\CHEM32\2\DATA\CA\_391\_14\CA391\_14\_A 2014-11-18 11-21-19\AM1837\_14\_1.D  
 Sample Name: Am 1837\_14



Data File C:\CHEM32\2\DATA\CA\_391\_14\CA391\_14\_A 2014-11-18 11-21-19\AM1837\_14\_1.D  
 Sample Name: Am 1837\_14



-> The purity factor exceeds the calculated threshold limit. <-

Pureza de Pico: Excelente

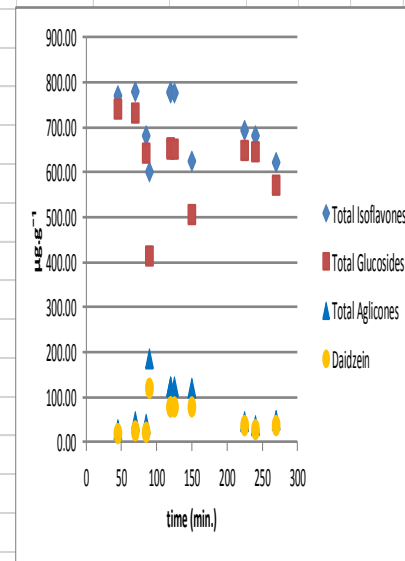
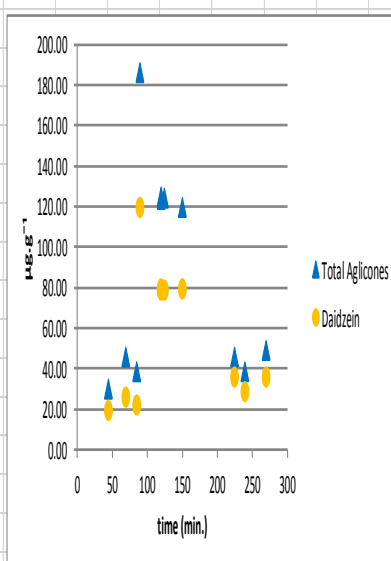
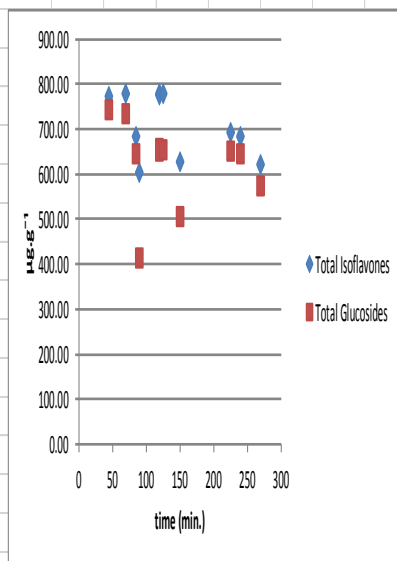
Purity factor : 979.930 (12 of 12 spectra exceed the calculated threshold limit.)  
 Threshold : 997.171 (Calculated with 12 of 12 spectra)  
 Reference : Peak start and end spectra (integrated) (5.712 / 5.812)  
 Spectra : 5 (Selection automatic, 5)  
 Noise Threshold: 0.206 (12 spectra, St.Dev 0.0637 + 3 \* 0.0475)

\*\*\* End of Report \*\*\*

## Anexo VI

## 4.2 ANOVA - Análise dos Resultados

					Minimizar							Maximizar							Minimizar	Minimizar	Maximizar			
ENSAIOS	T°C	Vel(rpm)	T°C	Vel(rpm)	t(min)	Daidzin	Glycitin	Genistin	Malonil-daidzin	Malonil-glycetin	Malonil-genistin	Daidzein	Glycicin	Acetyl-genistin	Genistein	Total Isoflavones	Total Glucosides	Total Aglicones						
1	-1	-1	37	7	240	49.87	20.66	37.00	91.65	16.97	281.66	28.73	1.74	0.26	7.71	682.35	644.17	38.19						
2	1	-1	73	7	85	8.78	21.14	178.20	86.78	17.46	257.23	21.91	1.51	0.22	15.12	681.34	642.80	38.54						
3	-1	1	37	13	225	57.28	19.85	176.19	104.35	29.40	259.53	35.90	1.67	0.25	7.68	692.10	648.85	45.25						
4	1	1	73	13	70	89.13	31.99	204.43	97.20	20.42	289.31	25.96	1.75	0.26	18.07	778.52	732.74	45.78						
5	-1.41	0	30	10	270	61.70	35.69	117.19	91.48	19.85	245.68	35.60	1.65	0.25	11.69	620.77	571.83	48.94						
6	1.41	0	80	10	45	75.22	14.72	252.70	92.94	19.17	286.47	19.30	1.80	0.27	8.48	771.06	741.49	29.58						
7	0	-1.41	55	5	150	51.03	14.83	93.71	85.28	20.08	239.87	78.90	1.83	0.27	38.92	624.73	505.08	119.65						
8	0	1.41	55	15	90	38.78	21.09	82.09	68.33	17.51	185.57	119.31	16.75	0.25	51.81	601.49	413.62	185.87						
9	0	0	55	10	120	54.15	24.67	182.93	99.78	25.81	267.23	78.36	11.91	0.23	33.41	778.48	654.80	123.68						
10	0	0	55	10	120	54.79	22.96	176.21	99.55	25.75	270.84	79.10	11.98	0.23	33.39	774.81	650.33	124.48						
11	0	0	55	10	125	54.47	23.81	179.57	99.66	25.78	269.03	78.73	11.94	0.23	33.40	776.65	652.57	124.08						



ENSAIOS	T°C	Vel(rpm)	T°C	Vel(rpm)	t(min)	Total Isoflavones	Total Glucosides	Total Aglicones	Daidzein
1	-1	-1	37	7	240	682.35	644.17	38.19	28.73
2	1	-1	73	7	85	681.34	642.80	38.54	21.91
3	-1	1	37	13	225	692.10	648.85	45.25	35.90
4	1	1	73	13	70	778.52	732.74	45.78	25.96
5	-1.41	0	30	10	270	620.77	571.83	48.94	35.60
6	1.41	0	80	10	45	771.06	741.49	29.58	19.30
7	0	-1.41	55	5	150	624.73	505.08	119.65	78.90
8	0	1.41	55	15	90	601.49	413.62	185.87	119.31
9	0	0	55	10	120	778.48	654.80	123.68	78.36
10	0	0	55	10	120	774.81	650.33	124.48	79.10
11	0	0	55	10	125	776.65	652.57	124.08	78.73

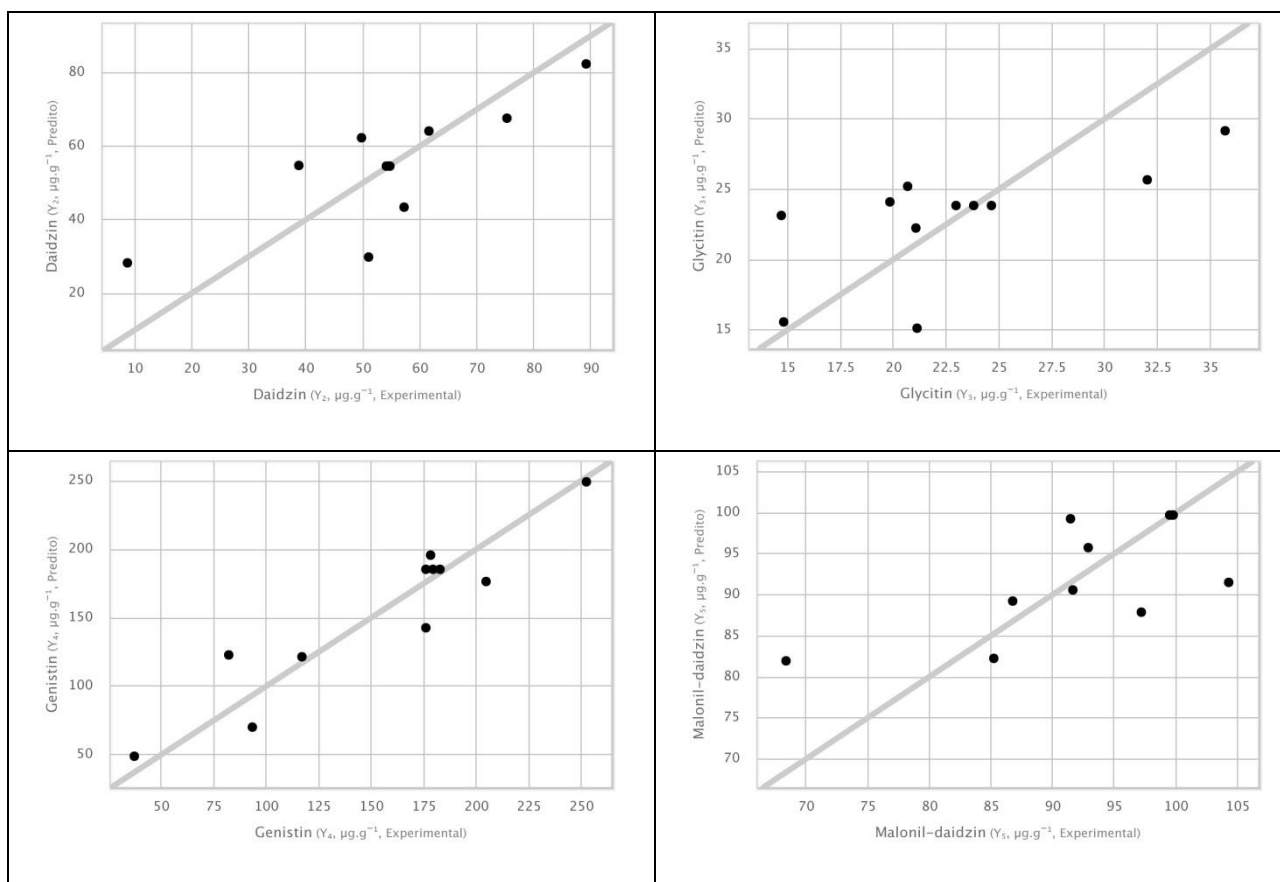
		-1.41	-1	0	1	1.41
Temp.	(C)	30	37	55	73	80
Vel.	(rpm)	5	7	10	13	15
	Tabela de Ys			Unidade		
	Y1	time		Minutes		
	Y2	Daidzin		$\mu\text{g.g}^{-1}$		
	Y3	Glycitin		$\mu\text{g.g}^{-1}$		
	Y4	Genistin		$\mu\text{g.g}^{-1}$		
	Y5	Malonil-daidzin		$\mu\text{g.g}^{-1}$		
	Y6	Malonil-glycitin		$\mu\text{g.g}^{-1}$		
	Y7	Malonil-genistin		$\mu\text{g.g}^{-1}$		
	Y8	Daidzein		$\mu\text{g.g}^{-1}$		
	Y9	Glycitein		$\mu\text{g.g}^{-1}$		
	Y10	Acetyl-genistin		$\mu\text{g.g}^{-1}$		
	Y11	Genistein		$\mu\text{g.g}^{-1}$		
	Y12	Total Isoflavones		$\mu\text{g.g}^{-1}$		
	Y13	Total Glucosides		$\mu\text{g.g}^{-1}$		
	Y14	Total Aglicones		$\mu\text{g.g}^{-1}$		

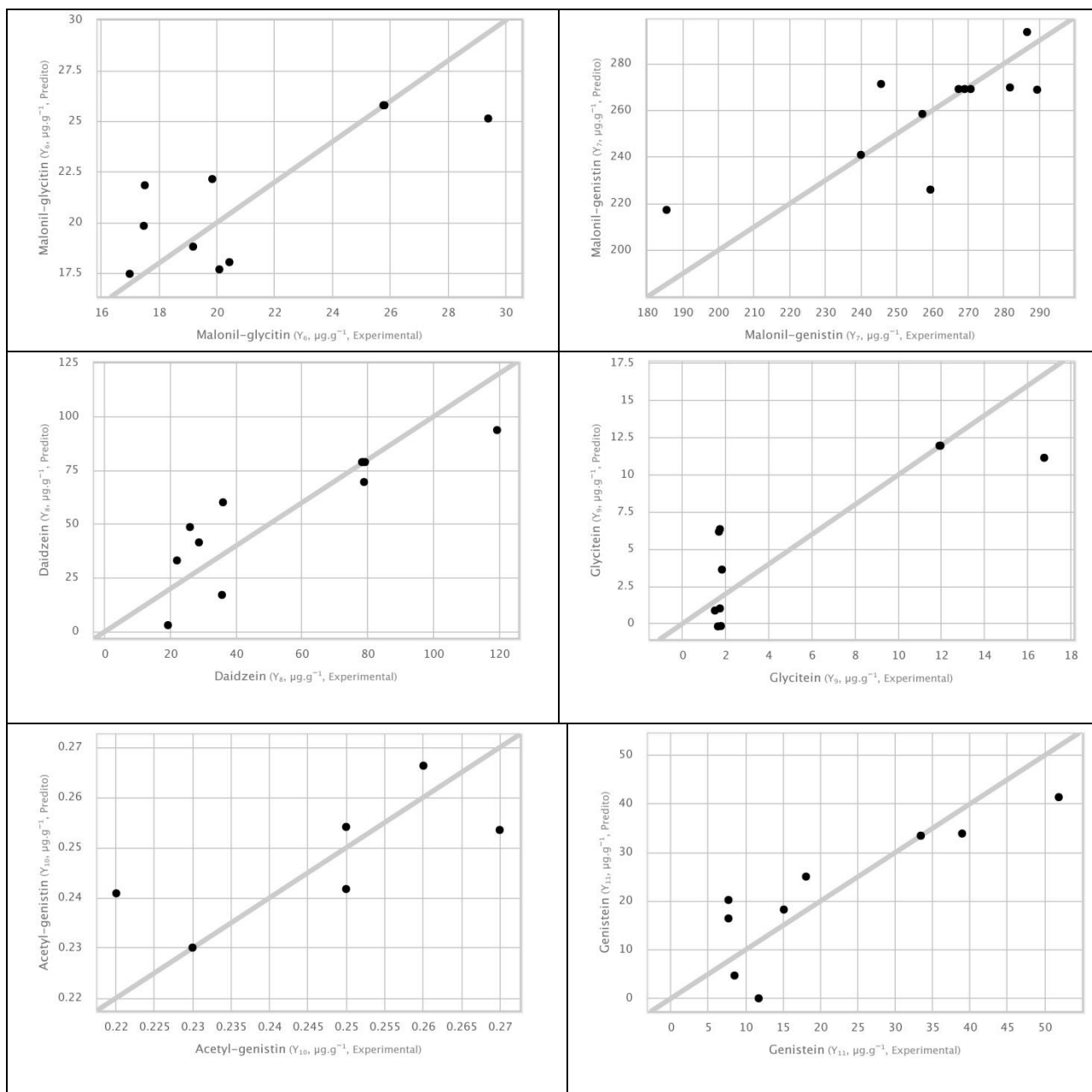
## ANOVA

Variation source	SQ	gl	QM	Fcal	p-value	R <sup>2</sup> (%)
<b>Hydration Time (min.)</b>						98.2
<b>Regression</b>	53712	3	17903.9	126.8	< 0,0001	
<b>Residuals</b>	988	7	141.2			
<b>Lack of Fit</b>	972	5	194.3	23.3	0.0416	
<b>Pure Error</b>	17	2	8.3			
<b>Total</b>	54700	10				
<b>Total Isoflavones (umol/100g)</b>						90.1
<b>Regression</b>	3.032.1	5	606.4	9.1	0.0151	
<b>Residuals</b>	333.9	5	66.8			
<b>Lack of Fit</b>	333.6	3	111.2	616	0.0016	
<b>Pure Error</b>	0.4	2	0.2			
<b>Total</b>	3.366.0	10				
<b>Total Glucosides (umol/100g)</b>						73.7
<b>Regression</b>	1480.3	5	296.1	2.8	0.1410	
<b>Residuals</b>	527.6	5	105.5			
<b>Lack of Fit</b>	526.0	3	175.3	221.3	0.0045	
<b>Pure Error</b>	1.6	2	0.8			
<b>Total</b>	2007.9	10				
<b>Total Aglicones (umol/100g)</b>						69.7
<b>Regression</b>	2885.3	1	2885.3	20.7	0.0014	
<b>Residuals</b>	1253.0	9	139.2			
<b>Lack of Fit</b>	1252.9	7	179.0	7447.4	0.0001	
<b>Pure Error</b>	0.0	2	0.0			
<b>Total</b>	4138.2	10				
<b>Total Daidzein (umol/100g)</b>						68.0
<b>Regression</b>	1163.1	1	1163.1	19.1	0.0018	
<b>Residuals</b>	547.9	9	60.9			
<b>Lack of Fit</b>	547.9	7	78.3	3721.1	0.0003	
<b>Pure Error</b>	0.0	2	0.0			
<b>Total</b>	1711.0	10				

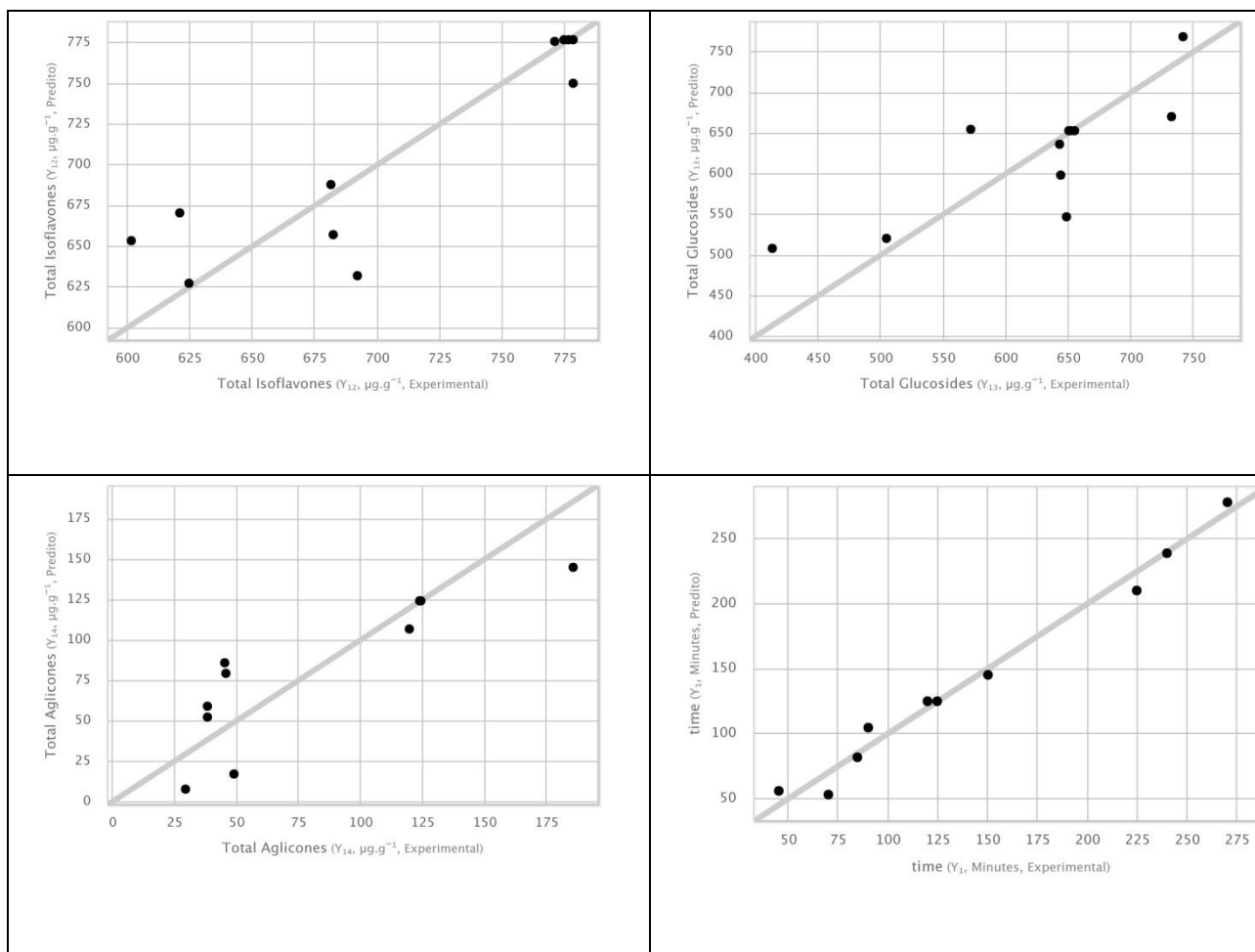
**Modelos codificados para as respostas porcentagem de variação explicada ( $R^2$ ),  $F_{cal}$  e  $F_{tab}$  (90% de confiança)**

Respostas	Modelos ajustados	$R^2$	$F_{cal}$	$F_t$
<b>Hydrataion Time (min.)</b>	$Y_1 = 124,71 - 78,52 x_1 + 21,03 x_1^2 - 14,36 x_2$	98,2	126,8	3,07
<b>Tot Isoflavones (<math>\mu\text{mol}/100\text{g}</math>)</b>	$Y_2 = 182,92 - 15,75 x_1^2 + 6,52 x_2 - 15,28 x_2^2 + 9,29 x_1 x_2$	82,8	9,1	3,45
<b>Tot Gucosides (<math>\mu\text{mol}/100\text{g}</math>)</b>	$Y_3 = 60 + 6,04 x_1 + 5,08 x_1^2 + 2,73 x_2 - 9,80 x_2^2 + 6,96 x_1 x_2$	73,7	2,8	3,45
<b>Tot Aglicones (<math>\mu\text{mol}/100\text{g}</math>)</b>	$Y_4 = 48,06 - 21,60 x_1^2$	69,7	20,7	3,36
<b>Tot Daidzein (<math>\mu\text{mol}/100\text{g}</math>)</b>	$Y_5 = 31,51 - 13,72 x_1^2$	68,0	19,1	3,36









Time Hydration										
Factors	Coefficients of regression	Standard error	t(5)	p - value	Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Quadratic mean	$F_{\text{Calc}}$	p-value
Mean	121.67	7.9	15.5	0.0000	Regression	53712	3	17904	126.8	0.0000
x1 (L)	-78.52	4.8	-16.3	0.0000	Residues	988	7	141		
x1 (Q)	21.98	5.7	3.8	0.0122	Lack of fit	972	5	194	23.3	0.0416
x2 (L)	-14.36	4.8	-3.0	0.0309	Pure error	17	2	8		
x2 (Q)	3.23	5.7	0.6	0.5978	Total	54700	10			
x1 x2	0.00	6.8	0.0	1.0000						

Daidzin											
Factors	Coefficients of regression	Standard error	t(5)	p - value		Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Quadratic mean	F <sub>Calc</sub>	p-value
Mean	54.5	10.1	5.4	0.0030		Regression	2517.8	5	503.6	1.6	0.3
x1 (L)	1.2	6.2	0.2	0.8501		Residues	1539.8	5	308.0		
x1 (Q)	5.6	7.4	0.8	0.4794		Lack of fit	1539.6	3	513.2	5011.6	0.0
x2 (L)	8.8	6.2	1.4	0.2151		Pure error	0.2	2	0.1		
x2 (Q)	-6.1	7.4	-0.8	0.4438		Total	4057.6	10			
x1 x2	18.2	8.8	2.1	0.0923							

Glycitin											
Factors	Coefficients of regression	Standard error	t(5)	p - value		Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Quadratic mean	F <sub>Calc</sub>	p-value
Mean	23.8	3.9	6.1	0.0018		Regression	171.2	5	34.2	0.7	0.6262
x1 (L)	-2.1	2.4	-0.9	0.4168		Residues	231.7	5	46.3		
x1 (Q)	1.2	2.9	0.4	0.7040		Lack of fit	230.3	3	76.8	105.0	0.0094
x2 (L)	2.4	2.4	1.0	0.3716		Pure error	1.5	2	0.7		
x2 (Q)	-2.5	2.9	-0.9	0.4280		Total	402.9	10			
x1 x2	2.9	3.4	0.9	0.4309							

Genistin											
Factors	Coefficients of regression	Standard error	t(5)	p - value		Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Quadratic mean	F <sub>Calc</sub>	p-value
Mean	179.6	17.4	10.3	0.00015		Regression	34456	4	8614	10.9	0.00638
x1 (L)	45.1	10.6	4.2	0.00817		Residues	4723	6	787		
x1 (Q)	5.8	12.7	0.5	0.66521		Lack of fit	4701	4	1175	104.097	0.00954
x2 (L)	18.6	10.6	1.7	0.1406		Pure error	23	2	11		
x2 (Q)	-42.7	12.7	-3.4	0		Total	39180	10			
x1 x2	-28.2	15.1	-1.9	0.11949							

Malonil-Daidzin											
Factors	Coefficients of regression	Standard error	t(5)	p - value		Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Quadratic mean	F <sub>Calc</sub>	p-value
Mean	99.7	5.9	16.9	0.0000		Regression	465.5	5	93.1	0.9	0.5485
x1 (L)	-1.2	3.6	-0.3	0.7445		Residues	522.0	5	104.4		
x1 (Q)	-1.1	4.3	-0.3	0.8075		Lack of fit	522.0	3	174.0	13,147.8	0.0001
x2 (L)	-0.1	3.6	0.0	0.9776		Pure error	0.0	2	0.0		
x2 (Q)	-8.8	4.3	-2.0	0.0958		Total	987.4	10			
x1 x2	-0.6	5.1	-0.1	0.9155							

Malonil Glycitin											
Factors	Coefficients of regression	Standard error	t(5)	p - value		Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Quadratic mean	F <sub>Calc</sub>	p-value
Mean	25.8	2.0	12.9	0.0000		Regression	121.6	5	24.3	2.0	0.2264
x1 (L)	-1.2	1.2	-1.0	0.3776		Residues	59.6	5	11.9		
x1 (Q)	-2.7	1.5	-1.8	0.1270		Lack of fit	59.6	3	19.9	22,082.3	0.0000
x2 (L)	1.5	1.2	1.2	0.2826		Pure error	0.0	2	0.0		
x2 (Q)	-3.0	1.5	-2.1	0.0927		Total	181.2	10			
x1 x2	-2.4	1.7	-1.4	0.2287							

Malonil-Genistin											
Factors	Coefficients of regression	Standard error	t(5)	p - value		Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Quadratic mean	F <sub>Calc</sub>	p-value
Mean	269.0	15.1	17.9	1E-05		Regression	5,027	5	1,005	1.5	0.339924775
x1 (L)	7.9	9.2	0.9	0.43219		Residues	3,406	5	681		
x1 (Q)	6.7	11.0	0.6	0.57106		Lack of fit	3,400	3	1,133	347.9	0.002867907
x2 (L)	-8.4	9.2	-0.9	0.40677		Pure error	7	2	3		
x2 (Q)	-20.0	11.0	-1.8	0		Total	8,433	10			
x1 x2	13.6	13.1	1.0	0.34665							

Daidzein											
Factors	Coefficients of regression	Standard error	t(5)	p - value		Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Quadratic mean	F <sub>Calc</sub>	p-value
Mean	78.7	13.5	5.8	0.0021		Regression	8299	5	1660	3.0	0.1246
x1 (L)	-5.0	8.3	-0.6	0.5739		Residues	2740	5	548		
x1 (Q)	-34.4	9.9	-3.5	0.0174		Lack of fit	2740	3	913	6671.6	0.0001
x2 (L)	8.5	8.3	1.0	0.3492		Pure error	0.3	2	0.14		
x2 (Q)	1.4	9.9	0.1	0.8926		Total	11040	10			
x1 x2	-0.8	11.7	-0.1	0.9495							

Glycitein											
Factors	Coefficients of regression	Standard error	t(5)	p - value		Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Quadratic mean	F <sub>Calc</sub>	p-value
Mean	11.9	2.4	5.0	0.0040		Regression	266	5	53	3.2	0.1163
x1 (L)	0.0	1.5	0.0	0.9959		Residues	84	5	17		
x1 (Q)	-6.1	1.7	-3.5	0.0170		Lack of fit	84	3	28	22774.6	0.0000
x2 (L)	2.7	1.5	1.8	0.1265		Pure error	0.0	2	0.00		
x2 (Q)	-2.3	1.7	-1.3	0.2429		Total	350	10			
x1 x2	0.1	2.1	0.0	0.9713							

Acetyl-Genistin											
Factors	Coefficients of regression	Standard error	t(5)	p - value		Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Quadratic mean	F <sub>Calc</sub>	p-value
Mean	0.2	0.0	26.1	0.0000		Regression	0.002	5	0	1.6	0.3098
x1 (L)	0.0	0.0	0.0	0.9698		Residues	0.001	5	0		
x1 (Q)	0.0	0.0	1.9	0.1233		Lack of fit	0.001	3	0	Infinity	-
x2 (L)	0.0	0.0	0.0	0.9698		Pure error	0.000	2	0.00		
x2 (Q)	0.0	0.0	1.9	0.1233		Total	0.003	10			
x1 x2	0.0	0.0	1.6	0.1619							

Genistein										
Factors	Coefficients of regression	Standard error	t(5)	p - value	Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Quadratic mean	F <sub>Calc</sub>	p-value
Mean	33.4	6.2	5.4	0.0030	Regression	8299	5	1660	3.0	0.1246
x1 (L)	1.7	3.8	0.4	0.6808	Residues	2740	5	548		
x1 (Q)	-15.6	4.5	-3.4	0.0184	Lack of fit	2740	3	913	6671.6	0.0001
x2 (L)	2.6	3.8	0.7	0.5175	Pure error	0.3	2	0.14		
x2 (Q)	2.1	4.5	0.5	0.6637	Total	11040	10			
x1 x2	0.7	5.4	0.1	0.8951						

Total Isoflavones											
Factors	Coefficients of regression	Standard error	t(5)	p - value		Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Quadratic mean	F <sub>Calc</sub>	p-value
Mean	776.6	26.2	29.6	0.0000		Regression	40283	5	8057	3.9	0.0806
x1 (L)	37.2	16.1	2.3	0.0681		Residues	10316	5	2063		
x1 (Q)	-26.8	19.1	-1.4	0.2191		Lack of fit	10309	3	3436	1020.5	0.0010
x2 (L)	9.3	16.1	0.6	0.5893		Pure error	6.7	2	3.37		
x2 (Q)	-68.3	19.1	-3.6	0.0160		Total	50599	10			
x1 x2	21.9	22.7	1.0	0.3800							

Total Glucosides											
Factors	Coefficients of regression	Standard error	t(5)	p - value		Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Quadratic mean	F <sub>Calc</sub>	p-value
Mean	652.6	47.0	13.9	0.0000		Regression	57386	5	11477	1.7	0.2813
x1 (L)	40.3	28.8	1.4	0.2207		Residues	33198	5	6640		
x1 (Q)	29.3	34.3	0.9	0.4314		Lack of fit	33188	3	11063	2214.7	0.0005
x2 (L)	-4.3	28.8	-0.2	0.8861		Pure error	10.0	2	5.00		
x2 (Q)	-69.3	34.3	-2.0	0.0991		Total	90585	10			
x1 x2	21.3	40.7	0.5	0.6232							

Total Aglycones											
Factors	Coefficients of regression	Standard error	t(5)	p - value		Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Quadratic mean	F <sub>Calc</sub>	p-value
Mean	124.1	21.2	5.9	0.0021		Regression	21052	5	4210	3.1	0.1183
x1 (L)	-3.3	13.0	-0.3	0.8087		Residues	6734	5	1347		
x1 (Q)	-55.9	15.4	-3.6	0.0152		Lack of fit	6734	3	2245	14029.1	0.0001
x2 (L)	13.5	13.0	1.0	0.3460		Pure error	0.3	2	0.16		
x2 (Q)	0.8	15.4	0.1	0.9596		Total	27786	10			
x1 x2	0.0	18.3	0.0	0.9981							

## Anexo VII

## 5. Autorização da editora para inclusão dos artigos já publicados

